

**Relazione tra ipovitaminosi D, sindrome metabolica,
diabete di tipo 2 e steatosi epatica non alcool-correlata (NAFLD)**

Dott.ssa Ilaria Barchetta

**Dottorato di Ricerca in Epatologia Sperimentale e Clinica
Sapienza Università di Roma**

**Coordinatore: Prof. Eugenio Gaudio
Sapienza Università di Roma**

**Tutor: Prof. Sergio Morini
Università Campus Bio-medico di Roma**

Abstract:

Gli studi sperimentali condotti per questa tesi hanno indagato la relazione tra l'ipovitaminosi D e la presenza di malattie del metabolismo come la SM, il T2D e la presenza di NAFLD in diverse popolazioni: soggetti afferenti presso gli ambulatori di Malattie Metaboliche per sospetta SM, con e senza NAFLD, soggetti normopeso e pazienti obesi. Lo studio ha evidenziato la presenza di una forte correlazione tra ridotti livelli sierici di 25(OH)D₃ e la presenza e severità di NAFLD, indipendentemente dalla presenza di SM e insulino-resistenza nelle diverse popolazioni studiate. Per approfondire il ruolo del tessuto adiposo nel determinare ipovitaminosi D, legata al possibile sequestro intra-adipocitario di questa molecola lipofila, è stata selezionata una popolazione adulta di soggetti obesi con o senza SM, confrontabili per sesso, età, BMI, circonferenza vita, circonferenza fianchi e percentuale di massa grassa. Attraverso questo sotto-studio è stato dimostrato che la presenza di ipovitaminosi D si associava alla diagnosi di SM indipendentemente dagli indici antropometrici e dalla massa grassa, suggerendo l'esistenza di un nesso causale tra ipovitaminosi D e fenotipo dismetabolico nelle popolazioni studiate. Per indagare il metabolismo della vitamina D in corso di epatite e comprendere se questa molecola potesse svolgere un'azione diretta sul fegato, è stata studiata l'espressione immunoistochimica delle 25-idrossilasi e del VDR in sede epatica in pazienti con NASH o HCV. Nei soggetti con NASH la presenza di basse concentrazioni sieriche di 25(OH)D₃ si associava ad un maggior danno epatocitario e la minore espressione del VDR su colangiociti ed epatociti correlava con un NAS score più severo. Nei pazienti con epatite da HCV è stata altresì osservata una correlazione diretta tra l'espressione del VDR e delle 25-idrossilasi negli epatociti e una ridotta espressione di CYP27A1 in presenza di fibrosi severa, indipendentemente dalla concentrazione sierica di vitamina D. Questo studio ha provato per la prima volta che il danno necro-infiammatorio in corso di epatite HCV-correlata è più accentuato nei pazienti con cellule infiammatorie scarsamente positive per il VDR. In conclusione, questo progetto dimostra la presenza di una forte associazione tra ipovitaminosi D e malattie metaboliche associate all'insulino-resistenza. La vitamina D potrebbe rivelarsi, pertanto, un determinante ancora poco indagato della risposta epatica al danno cronico indotto da differenti *noxae patogenae* e potrebbe influenzare direttamente la patogenesi, la progressione e la prognosi delle epatopatie su base metabolica e virale.

Indice

INTRODUZIONE	3
I. LA VITAMINA D: METABOLISMO E FUNZIONI PRINCIPALI	3
I.1. Sintesi	3
I.2. Attivazione	3
I.3. Meccanismo d'azione. Il recettore VDR	5
II. VITAMINA D, INSULINO-RESISTENZA E PATOLOGIE CORRELATE	5
II.1. L'obesità	5
II.2. La sindrome metabolica	6
II.3. Il diabete di tipo 2	8
II.4. Il fegato	9
STUDI SPERIMENTALI	13
III. RELAZIONE TRA IPOVITAMINOSI D E NAFLD	13
III.1. Razionale e scopi	13
III.2. Materiali e Metodi	13
III.3. Risultati	15
III.4. Conclusioni	20
IV. IPOVITAMINOSI D, OBESITÀ PATOLOGICA E SINDROME METABOLICA	20
IV.1. Razionale e scopi	20
IV.2. Materiali e Metodi	20
IV.3. Risultati	23
IV.4. Conclusioni	25
V. IPOVITAMINOSI D ED EPATOPATIE A DIVERSA ETIOLOGIA	26
V.1. Razionale e scopi	26
V.2. Materiali e Metodi	26
V.3. Risultati	28
V.4. Conclusioni	37
DISCUSSIONE	39
BIBLIOGRAFIA	40

Introduzione

I. La vitamina D: metabolismo e funzioni principali

Sintesi

La 1,25 diidrossi-vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) è il principale ormone steroideo coinvolto nella regolazione dell'omeostasi minerale. Nell'uomo, la sintesi di vitamina D avviene principalmente nell'epidermide. La vitamina D_3 è prodotta sulla superficie cutanea attraverso una reazione UVB-mediata, fotolitica, non enzimatica che converte il 7-deidrocolesterolo in previtamina D_3 . La previtamina D_3 è sottoposta a una serie di isomerizzazioni non enzimatiche anche nella cute. La fotoisomerizzazione cutanea che porta alla formazione di vitamina D è ridotta dalla presenza della melanina e dall'applicazione di creme solari anche a medio fattore di protezione ($\text{FP} \geq 8$), che riducono efficacemente la penetrazione cutanea delle radiazioni ultraviolette (De Luca HF, 2004). La vitamina D è rintracciabile anche in alcuni alimenti, come cereali (vitamina D_2), olio di pesce e tuorlo d'uovo (vitamina D_3). Dall'epidermide e dall'intestino, la vitamina D raggiunge il fegato attraverso il circolo ematico.

Attivazione

Nel parenchima epatico la vitamina D_3 viene convertita a 25-idrossivitamina D_3 - $25(\text{OH})\text{D}_3$ - da due citocromi epatocitari con localizzazioni e caratteristiche differenti: il citocromo P450 (CYP27A1) ha sede nel mitocondrio e presenta alta capacità e bassa affinità per la vitamina D, mentre il citocromo microsomiale CYP2R1 è caratterizzato da una maggiore affinità per questo substrato. Strutturalmente, il CYP2R1 adotta una conformazione chiusa con il canale di accesso al substrato ricoperto da una B-elica, che lascia esposta una stretta zona per il contatto con lo specifico ligando. Il sito attivo è rivestito da una sequenza conservata di residui prevalentemente idrofobici. La vitamina D_3 è ripiegata in una conformazione allungata con la catena laterale alifatica rivolta verso il gruppo eme del citocromo. Una mutazione del gene codificante per il CYP2R1 è stata riconosciuta essere causa di una forma genetica di rachitismo da carenza di vitamina D (Holick MF, 2004).

La $25(\text{OH})\text{D}_3$ è la forma più abbondante e stabile di vitamina D riscontrabile nel siero umano, qualità, queste, determinate dall'alta affinità con la quale si lega alla *Vitamin D binding protein* sierica (per l'88%) e alle altre proteine appartenenti alla superfamiglia dell'albumina presenti nel torrente ematico. Per questo motivo, la concentrazione sierica di $25(\text{OH})\text{D}_3$ è il miglior indicatore della quota totale di vitamina D presente nell'organismo, ivi inclusa quella proveniente dalla sintesi cutanea e quella di derivazione alimentare (Holick MF, 2004). Ampi studi di popolazione, condotti a latitudini relativamente elevate in Nord-America, Europa e Asia, hanno evidenziato che il picco sierico di metaboliti della vitamina D si raggiunge dopo circa 30-60 minuti dall'esposizione solare nei mesi estivi. Il fabbisogno di vitamina D viene completamente soddisfatto attraverso l'esposizione al sole di volto e gambe per un tempo totale di due ore a settimana (Lips R, 2007).

La $25(\text{OH})\text{D}_3$ è il pro-ormone immediato precursore della forma attiva della vitamina D, l'1,25-diidrossivitamina D che viene sintetizzata dalla $25(\text{OH})\text{D}_3$ -1 α -idrossilasi, un'ossilasi a funzione mista catalizzata dal citocromo CYP27B1 mitocondriale. Questo enzima è attualmente ritenuto l'unica fonte di vitamina D_3 nota nell'uomo ed è espresso principalmente -ma non esclusivamente- a livello delle cellule epiteliali del tubulo contorto prossimale del rene.

La sintesi di $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ è stimolata principalmente dall'aumento dei livelli sierici di paratormone (PTH) e dalla presenza di ipofosforemia mentre è inibita rispettivamente dal *fibroblast growing factor 23* (FGF-23), di origine osteocitaria, dal calcio e dal prodotto di reazione diidrossilato. Ulteriori dettagli in merito alla regolazione della vitamina D sono descritti nella figura 1.

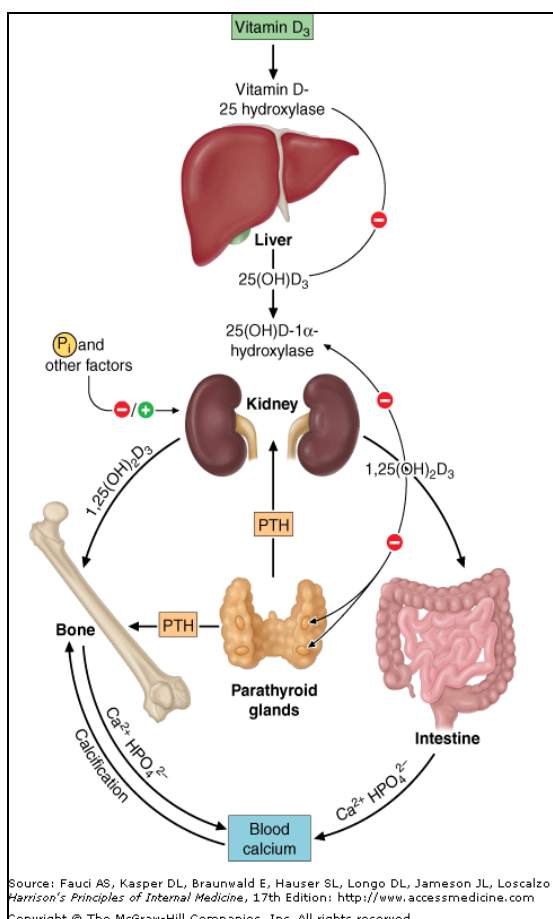


Figura 1 - Rappresentazione schematica del circuito di regolazione ormonale del metabolismo della vitamina D. Una riduzione del calcio sierico al di sotto di ~ 2.2 mmol/l (8,8 mg/dl) richiede un proporzionale aumento della secrezione PTH che mobilita il calcio dalle ossa. Il PTH promuove la sintesi renale di $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ che a sua volta stimola il riassorbimento di calcio dalle ossa e dall'intestino e regola attraverso un feedback negativo la sintesi di PTH.

La 25OHD_3 - 1α -idrossilasi è presente anche nei cheratinociti, ma si ritiene che la quota di vitamina D sintetizzata da queste cellule non sia di entità tale da influenzarne le concentrazioni sieriche. Un'elevata espressione di 25OHD_3 - 1α -idrossilasi è riscontrabile nel trofoblasto e nei siti infiammatori, in particolare nelle reazioni flogistiche granulomatoze, dove viene sintetizzato dalle cellule macrofagiche e indotto direttamente da citochine pro-infiammatorie come l'*interferon-gamma* ($\text{INF-}\gamma$) e il *tumor necrosis factor-alpha* ($\text{TNF-}\alpha$). La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ è la forma biologicamente attiva della vitamina D, espleta i suoi effetti biologici attraverso il legame ad alta affinità con lo specifico *Vitamin D Receptor* (VDR) ed è presente in circolo in concentrazioni pari allo 0.1% del suo pro-ormone $25(\text{OH})\text{D}_3$.

Meccanismo d'azione. Il recettore VDR

Il VDR è un recettore nucleare appartenente alla sottofamiglia che include i recettori per gli ormoni tiroidei, i recettori dei retinoidi e i recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi (PPAR). A differenza degli altri membri di questa famiglia, tuttavia, a tutt'oggi è stata isolata soltanto una isoforma di VDR.

A livello nucleare, il VDR si lega a specifiche sequenze di DNA formando un eterodimero con il recettore X dei retinoidi e reclutando una serie di coattivatori che modificano la cromatina e avvicinano il VDR all'apparato trascrizionale basale, con conseguente induzione dell'espressione del gene bersaglio.

Il meccanismo di repressione trascrizionale esercitato dal VDR varia in relazione ai diversi geni bersaglio e si espleta verosimilmente interferendo con l'attivazione di geni di trascrizione oppure attraverso il reclutamento di nuove proteine nel complesso VDR, con conseguente repressione trascrizionale. L'affinità del VDR per la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è approssimativamente di tre ordini di grandezza superiore a quella dimostrata per gli altri metaboliti della vitamina D.

La funzione più evolutivamente avanzata della vitamina D è quella di *ormone* ed è prerogativa delle specie animali fornite di endoscheletro, nelle quali la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ funge da regolatore circolante dell'omeostasi minerale e scheletrica dell'organismo.

Di contro, un ruolo "primordiale" della vitamina D è invece quello di *citochina*, sintetizzata per proteggere l'organismo dall'invasione di microrganismi provenienti dall'ambiente esterno.

Come *citochina* la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ viene sintetizzata principalmente a livello monocito-macrofagico e agisce in maniera autocrina-paracrina interagendo con il VDR presente su queste stesse cellule e modulando, quindi, la risposta autoimmune.

La differenza chiave tra il sistema della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ "*ormone*" e "*citochina*" è che in condizioni di ridotte concentrazioni sieriche di $25(\text{OH})\text{D}_3$ la conseguente ipercreazione di PTH è in grado di stimolare esclusivamente la CYP27B1-idrossilasi renale a sintetizzare il metabolita attivo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mentre non esercita alcun feed-back sull'enzima CYP27B1 1α -idrossilasi di derivazione monocito-macrofagica.

Nell'uomo, il VDR è presente in oltre trenta tessuti, tra cui principalmente intestino, tessuto adiposo, β -cellule pancreatiche, muscolo cardiaco e scheletrico. La vasta distribuzione dello specifico recettore è una delle dimostrazioni più chiare del ruolo della $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ "*ormone*" nella regolazione di differenti sistemi biologici.

II. Vitamina D, insulino-resistenza e patologie correlate

II.1. L'obesità

Gli studi recentemente effettuati su vitamina D e metabolismo hanno evidenziato la presenza di una stretta associazione tra ipovitaminosi D e obesità.

Un interessante esperimento condotto da Snijder *et al.* ha dimostrato che la concentrazione sierica di 25OHD_3 correla inversamente con la quantità di grasso totale corporeo misurato attraverso tecniche di assorbimetria a raggi X a doppia energia (Snijder MB, 2005). Da questa osservazione originano varie ipotesi che possono spiegare l'associazione tra tessuto adiposo e carente concentrazione sierica di vitamina D. È possibile che l'associazione tra vitamina D e obesità sia di tipo indiretto, legata al fatto che i soggetti obesi generalmente trascorrono meno tempo all'aperto rispetto agli individui magri e che questo si traduca in una insufficiente esposizione solare, con conseguente scarsa produzione di vitamina D sulla superficie cutanea.

In aggiunta, è noto che generalmente le persone affette da obesità indossano un tipo di abbigliamento che, lasciando scoperte ridotte superfici cutanee, può incidere negativamente sulla produzione cutanea di vitamina D.

Queste ipotesi sono state però confutate da altre evidenze che dimostrano come il ridotto livello sierico di 25(OH)D₃ riscontrabile in soggetti con obesità patologica rispetto a individui magri sia indipendente dall'esposizione solare (Mithala, 2009).

In alternativa, sono stati ipotizzati effetti negativi diretti dell'obesità sul bilancio della vitamina D. In quanto liposolubile, la vitamina D viene fisiologicamente sequestrata e immagazzinata nel tessuto adiposo ed è stato dimostrato che ad un maggior accumulo di questo ormone a livello adiposo corrisponde una minore biodisponibilità sierica della vitamina D di produzione endogena (Rosenstreich SJ, 1971).

Un elegante esperimento di fisiologia ha evidenziato che sebbene l'obesità non alteri le capacità di sintesi cutanea della vitamina D, nei soggetti obesi sono presenti modificazioni del rilascio dell'ormone dalla pelle al torrente ematico (Wortsman J, 2000). È possibile quindi che il tessuto adiposo sottocutaneo, buon deposito di vitamina D, sequestri una quantità di ormone superiore rispetto a quanto accade nell'individuo normopeso in virtù della maggior quota di adipe disponibile per questo processo. Dopo somministrazione orale di vitamina D₂ la concentrazione sierica di questa molecola nei magri e negli obesi è confrontabile, a testimonianza di una conservata capacità assorbitiva intestinale dei soggetti obesi, mentre la 25OHD₃ sierica è inversamente correlata all'indice di massa corporea (BMI) dell'individuo. Questo può essere spiegato dal fatto che, in seguito al passaggio dalla mucosa intestinale al circolo linfatico e al trasferimento nel sangue, una quota significativa di 25OHD₃ è sequestrata nell'abbondante pool di tessuto adiposo.

Una carenza di vitamina D, a sua volta, può favorire l'accumulo di adipe attraverso il rilascio di PTH da parte delle paratiroidi, sensibili alla concentrazione sierica di 25OHD₃, aumentando i livelli circolanti di calcio, con effetto lipogenico.

II.2. La sindrome metabolica

La sindrome metabolica è un'entità patologica caratterizzata da un aumentato rischio cardiovascolare e viene diagnosticata in soggetti con almeno tre anomalie metaboliche tra: obesità centrale (circonferenza vita > 102 cm nell'uomo e > 88 cm nella donna), ipertrigliceridemia (trigliceridi > 150 mg/dl o terapia specifica), ridotti livelli di colesterolo HDL (< 40 mg/dl nell'uomo, < 50 mg/dl nella donna o terapia specifica), ipertensione arteriosa (sistolica ≥ 130 mmHg, diastolica ≥ 85 mmHg o terapia specifica), alterata regolazione glucidica (glicemia a digiuno ≥ 100 mg/dl o glicemia dopo OGTT ≥ 140 mg/dl o precedente diagnosi di diabete mellito di tipo 2) (Grundy SM, 2005).

In Italia la prevalenza di sindrome metabolica è del 10% e secondo recenti analisi epidemiologiche il 22% della popolazione italiana con ipertensione arteriosa è affetta anche da sindrome metabolica. L'incidenza di malattie cardiovascolari e la mortalità per eventi ischemici nei soggetti ipertesi con sindrome metabolica è circa il doppio di quella riscontrata nei pazienti con ipertensione arteriosa isolate (Scholze, 2010). La prevalenza del diabete di tipo 2 è circa sei volte più elevata nei soggetti con sindrome metabolica e l'incidenza e la mortalità per malattia cardiovascolare nei diabetici aumentata proporzionalmente con ogni ulteriore componente della sindrome metabolica (D'Agostino RB, 2007; Hypponen E, 2006). L'ipotesi più diffusa e accreditata per spiegare la fisiopatologia della sindrome metabolica è l'insulino-resistenza, causata da un'anomalia, ancora non del tutto chiara, del meccanismo d'azione dell'insulina.

Il contributo iniziale allo sviluppo dell'insulino-resistenza è dato dall'aumento del flusso degli FFA nel torrente ematico. Nel fegato, l'accumulo di FFA si traduce in un aumento della

produzione di glucosio e trigliceridi, con secrezione di lipoproteine a bassissima densità (VLDL). A questo si associano altre alterazioni di lipidi e lipoproteine come la riduzione delle lipoproteine ad alta densità (HDL) e la maggiore sintesi di lipoproteine a bassa densità (LDL). I FFA inoltre riducono la sensibilità insulinica nel muscolo inibendo l'assorbimento di glucosio insulino-mediato. A questo si associa un diminuito partizionamento del glucosio in glicogeno, accumulo dei lipidi in trigliceridi, iperglicemia e iperinsulinemia. L'iperinsulinemia può determinare un maggior riassorbimento di sodio e iperattività del sistema nervoso simpatico, contribuendo all'insorgenza di ipertensione arteriosa.

Un sovrapposto stato proinfiammatorio contribuisce all'insulino-resistenza indotta dai FFA. L'aumentata produzione d'interleuchina 6 (IL-6) e TNF- α di origine adipocitaria e macrofagica incrementa l'insulino-resistenza sistemica facilitando la lipolisi del tessuto adiposo periferico con rilascio in circolo di ulteriori FFA (Klover PJ, 2003).

L'IL-6 e altre citochine favoriscono la produzione epatica di glucosio, VLDL e fibrinogeno e aumentano la sintesi dell'inibitore tissutale del plasminogeno (PAI-1) da parte del tessuto adiposo, inducendo uno stato profibrotico (Cai D, 2005).

Gli altri livelli circolanti di citochine stimolano la sintesi epatica di proteina C-reattiva (PCR); questo milieu si associa, inoltre, a una ridotta produzione di molecole anti-infiammatorie e di adiponectina (Tarantino G, 2009).

I meccanismi patogenetici qui descritti sono illustrati dettagliatamente nella Figura 2.

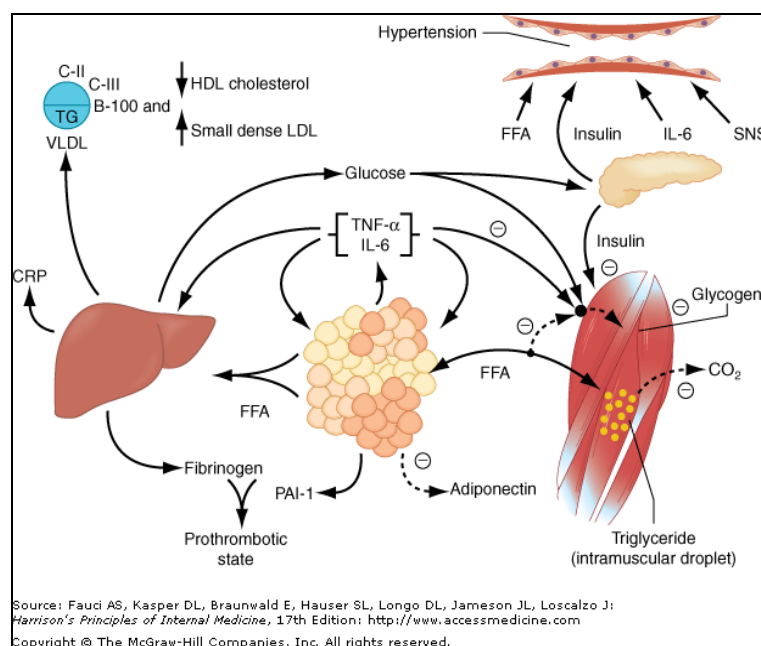


Figura 2 - Patogenesi dell'insulino-resistenza.

Il deficit di vitamina D è stato associato alla sindrome metabolica e all'insulino-resistenza in maniera indipendente dalla quantità di tessuto adiposo presente nell'organismo (Chiu KC, 2004; Liu S, 2005; Martini LA, 2006).

Immagini di tomografia computerizzata, permettendo la valutazione quantitativa dei volumi di tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo, hanno mostrato che il volume del compartimento viscerale è più strettamente associato al deficit di vitamina D rispetto al grasso sottocutaneo, sebbene quest'ultimo sia volumetricamente più rappresentato nell'organismo (Cheng S, 2010).

Il tessuto adiposo viscerale è metabolicamente attivo ed è sito di produzione di adipochine, mediatori dell'emostasi e della fibrinolisi e a fattori di crescita. La presenza di obesità viscerale si associa inoltre ai classici fattori di rischio cardiovascolare come l'ipertensione, l'ipertrigliceridemia, l'alterata regolazione glucidica e, in definitiva, alla sindrome metabolica (Scholze J, 2010).

Sia l'ipovitaminosi D sia la presenza di sindrome metabolica alterano l'equilibrio citochinico dell'organismo in favore dell'espressione di un pattern pro-infiammatorio, che conduce a uno stato di flogosi sistemica significativamente correlato al verificarsi di eventi cardiovascolari (Martins D, 2007; Anderson JL, 2010).

La vitamina D, inoltre, regola direttamente il sistema renina-angiotensina sopprimendo l'espressione del gene che codifica per la renina. Grazie alla presenza del VDR sulla superficie delle cellule muscolari lisce ed endoteliali, la vitamina D può modulare direttamente la proliferazione cellulare ed i meccanismi di infiammazione e trombogenesi (Wu-Wong JR, 2006).

Il VDR è espresso anche negli altri tessuti insulino-sensibili. Esperimenti condotti *in vitro* hanno dimostrato che la vitamina D aumenta l'espressione dei recettori insulinici e facilita il trasporto insulino-mediato del glucosio (Borissova AM, 2003). Nel tessuto adiposo, le alterazioni della concentrazione intracellulare di calcio legate al deficit di 25(OH)D₃ conducono ad un accumulo di trigliceridi sia attraverso la stimolazione della lipogenesi *de novo* sia mediante una disregolazione della lipolisi insulino-mediata. In ultimo, la vitamina D è in grado di attivare direttamente il fattore trascrizionale PPAR- δ , implicato nella regolazione del metabolismo dei FFA nel muscolo e nel tessuto adiposo.

Questi effetti causati dalla ipovitaminosi D sono testimoniati anche da numerosi studi epidemiologici internazionali che hanno osservato come la carenza di calcitriolo non debba essere considerata più solamente un appannaggio dei soggetti con disturbi del metabolismo osteocalcico bensì sia una condizione altamente prevalente nella popolazione generale, soprattutto nei soggetti affetti da sindrome metabolica (Bruyere O, 2007; Holick MF, 2007).

II.3. Il diabete di tipo 2

Il diabete di tipo 2 è considerato uno stato di insulino-resistenza (compenso β -cellulare) associato ad insulinopenia ed è caratterizzato dal progressivo deterioramento della secrezione insulinica con eventuale perdita di massa β -cellulare. Diversi studi epidemiologici suggeriscono che ridotti livelli sierici di vitamina D si associano ad alterazioni del metabolismo glucidico (Tai K, 2008). Lo studio longitudinale Medical Research Council Ely Prospective Study ha riscontrato un'associazione inversa tra i livelli basali di 25OHD₃ e la glicemia, l'insulinemia e l'HOMA-IR di adulti europei valutati dopo 10 anni di follow-up, indipendentemente dai valori presenti al baseline (Forouhi NG, 2008; Koshiyama H, 2007). Il deficit di vitamina D e il diabete di tipo 2 condividono alcuni fattori di rischio come l'etnia afro-americana, asiatica ed ispanica, l'aumento dei depositi di tessuto adiposo, l'età e lo stile di vita sedentario (che può tradursi in una riduzione del tempo speso all'aria aperta e in una scarsa esposizione solare). Sono state inoltre descritte variazioni stagionali della glicemia e dell'insulinemia che correlano con le variazioni stagionali della concentrazione sierica di 25(OH)D₃. Vari meccanismi biologici potrebbero spiegare il ruolo nella omeostasi glucidica di questo ormone che sembra favorire non solamente la sensibilità insulinica (vedi Introduzione § II.1), ma anche la secrezione β -cellulare (Palomer X, 2008; Pittas AG, 2007).

La 1,25(OH)₂D stimola la risposta insulinica grazie alla presenza di VDR sulla superficie delle β cellule, attività, questa, che si verifica esclusivamente durante l'iperglicemia, non influenzando i livelli di l'insulinemia basale (Borissova AM, 2003).

Nella β cellula è espresso l'enzima 1 α -idrossilasi che è in grado di aumentare significativamente i livelli di 1,25(OH) $_2$ D *in loco* (Bland R, 2004).

La vitamina D favorisce la secrezione insulinica anche indirettamente, attraverso la regolazione del calcio extracellulare e del flusso di calcio attraverso la β cellula (Orwall E, 1994; Boucher BJ, 1995).

La secrezione insulinica è infatti un processo calcio-dipendente, alterazioni del flusso di calcio possono pertanto avere effetti sfavorevoli sulla funzione β -cellulare (squilibrio tra pool del calcio intra ed extracellulare con alterazione della normale secrezione insulinica).

In alcuni studi è stata osservata un'associazione tra deficit di vitamina D e secrezione insulinica glucosio-indotta (Bourlon PM, 1999), ma questi dati non sono stati confermati da successive osservazioni. In particolare, nei soggetti con sindrome metabolica, le concentrazioni sieriche di 25(OH)D $_3$ non correlano né con l'azione né con la secrezione insulinica durante test di tolleranza glucidica intra-venoso (IVGTT) (Gulseth HL, 2010).

Dai dati finora presenti in letteratura, perciò, è plausibile ipotizzare un ruolo concreto della vitamina D nel migliorare la sensibilità insulinica e nel facilitare la funzione β cellulare ma questa azione potrebbe non essere efficace in situazioni di insulinopenia conclamata e di scompenso diabetico.

II.4. Il fegato

La vitamina D è coinvolta nella regolazione della proliferazione e differenziazione cellulare e nell'immunomodulazione in diversi tessuti e organi; è in grado di inibire la sintesi di metallo-proteasi (MMP, una famiglia di endoproteasi zinco-dipendenti coinvolte nella degradazione delle componenti della matrice extracellulare) sia direttamente che attraverso induzione dei loro inibitori (Koli K, 2000). È ben noto che un alterato bilancio tra MMP2 e MMP9 e loro inibitori favorisce lo sviluppo di fibrosi in corso di epatite HCV-correlata (Bruno CM, 2009). Ridotti livelli sierici di 1,25(OH) $_2$ D sono associati ad aumento delle MMP2 e 9 circolanti, condizione questa che si è dimostrata regredire in seguito alla supplementazione orale con vitamina D (Timms, 2002).

Tra gli altri effetti noti della 1,25(OH) $_2$ D si conoscono il ruolo soppressivo sulla proliferazione dei fibroblasti e sulla sintesi di collagene (Dobak J, 1994). Questi meccanismi antifibrogenici sono rilevanti nella patogenesi delle malattie epatiche croniche. Sebbene gli epatociti siano la principale fonte di MMPs e dei loro inibitori, la loro sintesi non sembra essere significativamente ridotta in corso di cirrosi epatica (García de León Mdel C, 2006). Di conseguenza, il deficit di vitamina D nei pazienti affetti da epatopatia cronica può influenzare la velocità di progressione della fibrosi. Inoltre, il deficit di MMPs sembra avere effetti protettivi sul danno epatico di base ischemica (Hamada T, 2008). Circa un terzo dei soggetti con epatopatia cronica è affetto da deficit severo di vitamina D (Arteh J, 2010). Una causa di questa associazione potrebbe essere la riduzione della funzione 25-idrossilatoria degli epatociti che si osserva nelle epatopatie su base colestatica e nella cirrosi alcolica e che è proporzionale all'entità della disfunzione epatica. Questa ipotesi è però confutata da altri studi che hanno riscontrato un deficit di idrossilazione epatica solo negli stati avanzati di epatopatia cronica e da altri in cui la funzione di 25-idrossilasi sembra essere conservata anche nelle cirrosi più severe (Skinner RK, 1977; Compston JE, 1986). Quest'ultima osservazione è avvalorata dall'assenza di una correlazione significativa tra i test biochimici di funzionalità epatica e i livelli sierici di 1,25(OH) $_2$ D (Arteh J, 2010). Altri meccanismi che potrebbero spiegare l'elevata prevalenza di ipovitaminosi D negli epatopatici rispetto ai soggetti sani potrebbero essere: la scarsa esposizione al sole, il carente introito con la dieta e/o una ridotta fotoattivazione cutanea del 7-deidrocolesterolo a vitamina D $_3$ in presenza di ittero.

II.4.1 NAFLD e NASH

Il termine NAFLD (steatosi epatica non alcool-correlata) si riferisce ad un ampio spettro di tipologie clinico-istologiche caratterizzate da un accumulo di lipidi in sede intraepatocitaria con possibile evoluzione dalla steatosi semplice alla steatoepatite (NASH, steatosi associata ad attività necroinfiammatoria) con una componente fibrosa più o meno importante fino alla cirrosi con insufficienza epatica (McCullough AJ, 2004; Farrell GC, 2006).

Nei paesi occidentali la prevalenza della NAFLD è del 20-30% nella popolazione generale (Bedogni G, 2007; Browning JD, 2004) e raggiunge l'80% nei soggetti obesi e con diabete mellito di tipo 2 (Leite NC, 2009), dove la presenza di steatosi epatica aumenta il rischio di infarto miocardico/rivascolarizzazione coronarica, ictus ischemico e morte per malattia cardiovascolare (CVD), indipendentemente da altri fattori di rischio (Targher G, 2010) (Figura 3).

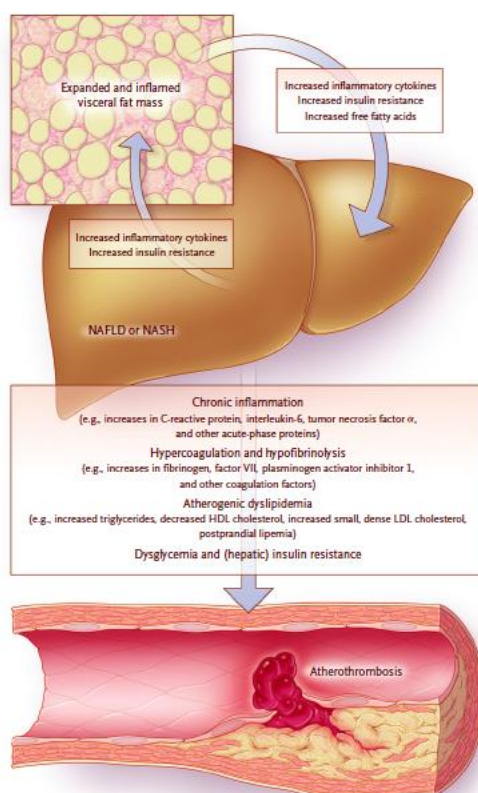


Figura 3 - CVD in corso di NAFLD. I meccanismi biologici potenzialmente responsabili dell'accelerata aterogenesi probabilmente hanno origine dall'espansione del tessuto adiposo; il fegato è sia bersaglio dello stato infiammatorio sistemico sia fonte di molecole proaterogeniche in grado di amplificare il danno arterioso. (Targher G. et al., NEJM 2010)

La coesistenza di diabete mellito di tipo 2 e NAFLD, inoltre, può condurre allo sviluppo di cirrosi epatica nel 20% dei casi (Gupte P, 2004; Pawell EE, 2005). Nei soggetti dismetabolici con steatosi rilevabile all'ecografia epatica, l'attività necro-infiammatoria e la fibrosi possono coesistere nel 2-3% dei casi. Attualmente, la NAFLD viene considerata la principale causa di cirrosi criptogenetica e di ipertransaminasemia cronica in soggetti asintomatici, in assenza di documentate cause virali, genetiche, tossiche e dismetaboliche di danno epatico (Caldwell SH, 2004) (Figura 4).

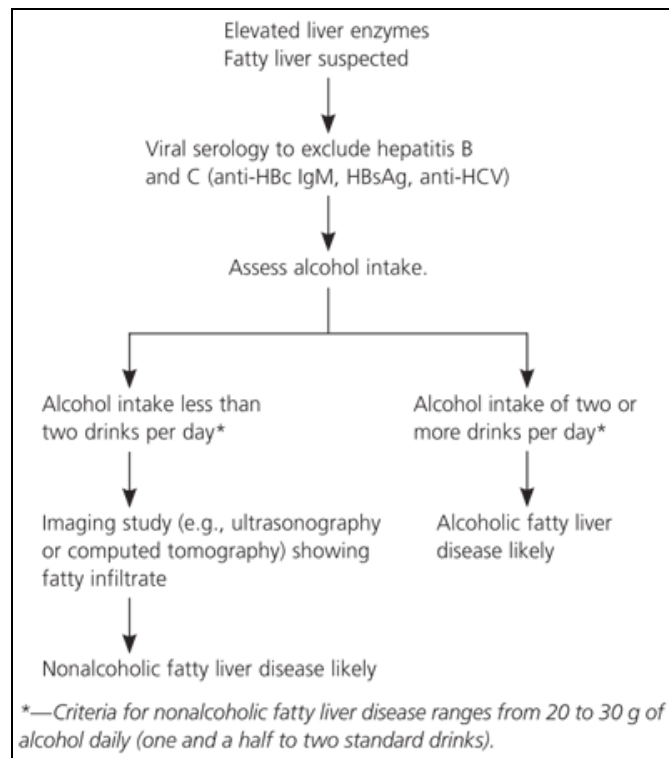


Figura 4 - NAFLD. Algoritmo diagnostico.

Patogenesi

I trigliceridi che si accumulano nel fegato in corso di NAFLD derivano principalmente da tre fonti: alimentazione (1- biosintesi dai carboidrati ingeriti, 2- uptake dei chilomicroni remnants; 3- spillover dei chilomicroni con rilascio di FFA nel plasma), lipogenesi *de novo* e rilascio di FFA dai depositi periferici di tessuto adiposo. Quest'ultima fonte giustifica il 60% dei depositi di grasso nel fegato nei soggetti alimentati con una dieta nutrizionalmente equilibrata. È noto che l'insulino-resistenza riduca la soppressione insulino-mediata della lipolisi adipocitaria, con conseguente aumento dei FFA circolanti e dell'insulino-resistenza, sia nel muscolo sia nel fegato. Per queste ragioni, la NAFLD è storicamente considerata l'epifenomeno epatico della sindrome metabolica attribuibile al rilascio di FFA dal tessuto adiposo nel flusso sanguigno e loro deposizione negli epatociti. Pertanto, l'aumento di stoccaggio dei lipidi intraepatici è dovuto alla compromissione della β -ossidazione dei FFA e alla sintesi di VLDL di dimensioni maggiori che sono dismesse dagli epatociti con difficoltà. Tuttavia, recenti ricerche hanno ipotizzato che la steatosi epatica abbia un ruolo chiave nel *determinare* insulino-resistenza. Secondo questa teoria, la NAFLD sarebbe il *first hit* che conduce alla sindrome metabolica (Kotronen A, 2007). In particolare, in corso di steatosi epatica l'azione dell'insulina sul metabolismo glucidico e sulla produzione di VLDL è significativamente compromessa, con conseguente iperglicemia, iperinsulinemia e ipertrigliceridemia compensatorie e, in caso di deficit relativo d'insulina, insorgenza di diabete mellito tipo 2.

Studi recenti hanno evidenziato una relazione tra infiammazione sistemica di basso grado, obesità e condizioni coesistenti, come l'insulino-resistenza, il diabete tipo 2 e la steatosi epatica, intesa sia come NAFLD che come NASH (Angelico F, 2005; Barbato A, 2009). È stato dimostrato che i farmaci anti-infiammatori possono ridurre il grado di insulino-resistenza, suggerendo che l'infiammazione possa direttamente esserne coinvolta nella patogenesi (Hundal RS, 2002). I mediatori pro-infiammatori di sintesi epatica che aumentano in corso di NAFLD sono la proteina C-reattiva (PCR), l'IL-6, il fibrinogeno e l'attivatore tissutale del plasminogeno-1 (PAI-1). Il fegato steatosico, quindi, contribuisce alla sintesi di

mediatori infiammatori in maniera indipendente dal tessuto adiposo. In corso di NAFLD vengono attivati la I κ B chinasi (IKK) e l'NF- κ B. Tra i fattori di trascrizione inducibili che controllano l'espressione genica, quest'ultimo svolge un ruolo centrale e evolutivamente conservato nel coordinare l'espressione di vari mediatori solubili pro-infiammatori (citochine e chemochine) e molecole di adesione dei leucociti.

Nelle cellule quiescenti, NF- κ B è sequestrato nel citoplasma da un inibitore di NF- κ B (I κ B) che maschera il segnale di localizzazione nucleare presente lungo la sequenza della proteina NF- κ B. Il trattamento di cellule con citochine pro-infiammatorie come TNF- α e IL-1, o con prodotti batterici come il lipopolisaccaride, porta all'attivazione di uno specifico complesso IKK β che fosforila I κ B, inducendo l'ubiquitinazione e la degradazione di I κ B. In questa maniera NF- κ B può traslocare nel nucleo dove agisce come fattore di trascrizione sovraregolando la produzione e la secrezione di IL-6, che induce insulino-resistenza all'interno degli epatociti.

Nell'ambito delle patologie correlate all'insulino-resistenza, è stata di recente riscontrata una associazione tra bassi livelli sierici di 25(OH)D₃ e steatosi/steatoepatite non alcool-correlata (Targher G, 2007). In questo studio, bassi livelli di vitamina D correlavano con la presenza di NAFLD indipendentemente dal grado di insulino-resistenza e dalla coesistenza di sindrome metabolica.

Evidenze sperimentali dimostrano che la vitamina D è in grado, *in vitro*, di ridurre l'insulino-resistenza FFA indotta (Zhou QG, 2008). Un deficit di vitamina D, quindi, potrebbe condurre non solo a insulino-resistenza periferica ma, soprattutto, a un peggioramento della sensibilità insulinica nel fegato.

II.4.2 HCV

Studi recenti hanno dimostrato un'associazione tra ridotti livelli sierici di 25(OH)D₃ e presenza di epatopatia cronica HCV-relata (Petta S, 2010).

Il ruolo della vitamina D è stato indagato nell'ambito di due diverse tipologie di pazienti, quelli sottoposti a trapianto epatico e soggetti immunocompetenti. Nei primi, i livelli sierici di 25(OH)D₃ al momento del trapianto predicono il rischio di rigetto cellulare acuto: in questi pazienti la supplementazione con alte dosi di calcitriolo sembra essere in grado di prevenire l'insorgenza di rigetto (Bitetto D, 2011). Nei soggetti immunocompetenti affetti da HCV, invece, insufficienti livelli sierici di 25(OH)D₃ correlano con una minore risposta virale sostenuta (SVR) durante il trattamento antivirale tradizionale (Petta S, 2010).

Recenti studi clinici hanno evidenziato una maggiore risposta virologica precoce nei pazienti HCV+ trattati con standard di cura addizionati con vitamina D rispetto alle terapie tradizionali (interferone+ribavirina) (Bitetto D, 2011; Lange CM, 2011). A livello istologico, l'espressione epatica del CYP27A1, deputato alla 25-idrossilazione della vitamina D, correla direttamente con i livelli sierici di 25(OH)D₃ e inversamente con la severità del danno necro-infiammatorio nei pazienti affetti da HCV. La presenza di ipovitaminosi D è però riscontrabile anche in caso di fibrosi minima, suggerendo pertanto che la ridotta funzionalità epatica non può spiegarne del tutto le cause.

La vitamina D attiva esercita un ruolo antimicrobico in diversi distretti dell'organismo (Thacher TD, 2011), come dimostra l'evidenza che bassi livelli sierici di vitamina D favoriscono l'insorgenza di infezioni virali del tratto respiratorio e che la supplementazione di calcitriolo previene l'infezione da virus influenzale (Grant WB, 2010). Inoltre il rischio di essere infettati da *Mycobacterium tuberculosis* aumenta nei soggetti con deficit di vitamina D (Noaham KE, 2008).

In corso di infezione epatica da HCV può essere ipotizzato che la vitamina D agisca facilitando la clearance del virus durante la terapia antivirale e che, di conseguenza, svolga un'azione diretta e indiretta nel modulare la risposta infiammatoria nel parenchima epatico.

Studi Sperimentali

III. Relazione tra ipovitaminosi D e NAFLD

III.1 Razionale e scopi

La vitamina D è un ormone lipofilo essenziale per l'equilibrio del calcio e fosfato e per la regolazione del sistema osteo-metabolico. È sintetizzato sulla pelle attraverso una reazione UV-mediata e successivamente subisce due idrossilazioni consecutive, rispettivamente in posizione 25 nel fegato e in posizione 1 α nel rene, con la produzione del metabolite attivo 1,25(OH)₂ vitamina D, o calcitriolo (vedi Introduzione § I.1)

Nella popolazione adulta, la prevalenza di ipovitaminosi D è dal 5% al 30%, ma raggiunge un picco del 75% nei soggetti affetti da sindrome metabolica (SM). Diversi studi hanno dimostrato un legame tra bassi livelli sierici di vitamina D e aumento del rischio cardiovascolare. I soggetti con carenza di vitamina D hanno un maggior rischio di sviluppare patologie connesse con l'insulino-resistenza, come obesità, sindrome metabolica e diabete mellito tipo 2 (vedi Introduzione § II).

Sulla base di queste evidenze si può affermare che il deficit di vitamina D non deve essere considerato appannaggio esclusivo dei pazienti affetti da patologie osteo-metaboliche.

Recentemente è stata riscontrata un'associazione tra deficit di vitamina D e presenza di steatoepatite (NASH) diagnosticata istologicamente in pazienti affetti da epatopatia (Targher G, 2007).

La NAFLD è una condizione patologica consistente in uno spettro di malattie del fegato causata dall'accumulo di trigliceridi all'interno degli epatociti (steatosi epatica). Nei paesi sviluppati, NAFLD è osservata nel 20-30% della popolazione generale e fino all'80% dei pazienti diabetici tipo 2 (Leite NC, 2009). La steatosi epatica è storicamente considerata la componente epatica della SM ed è legata alla condizione di insulino-resistenza che aumenta il rilascio di FFA dal tessuto adiposo nel flusso sanguigno e favorisce la loro deposizione in epatociti. Pertanto, l'aumento di stoccaggio dei lipidi intraepatici è dovuta alla compromissione della β -ossidazione dei FFA e alla sintesi di VLDL disfunzionali, difficilmente dismesse dagli epatociti.

La vitamina D è in grado di ridurre l'insulino-resistenza indotta dai FFA, sia nei tessuti periferici sia negli epatociti (Zhou QG, 2008). Bassi livelli sierici di vitamina D, verosimilmente, possono predisporre ad accumulo di lipidi intraepatici con conseguente NAFLD. Scopo di questo studio è stato pertanto valutare l'associazione tra ipovitaminosi D e presenza/grado di NAFLD in pazienti senza segni evidenti di epatopatia e con transaminase nella norma.

III.2 Materiali e Metodi

Popolazione

Per questo studio sono stati arruolati 262 soggetti consecutivi afferenti presso gli ambulatori di Medicina Interna e Diabetologia della Sapienza, Università di Roma, per sospetta SM. I criteri di inclusione applicati per l'ingresso nello studio sono stati: enzimi di epatocito-necrosi nella norma, anamnesi negativa per abuso presente e/o passato di alcol (definito da un consumo medio giornaliero >30 g/die negli uomini e >20 g/die nelle donne), negatività per

l'antigene di superficie dell'epatite B e per l'anticorpo anti virus dell'epatite C, assenza di storia e segni di cirrosi epatica e di altre malattie croniche del fegato. Tutti i partecipanti allo studio sono stati sottoposti ad anamnesi, esame obiettivo, prelievo ematico venoso ed ecografia dell'addome superiore per la valutazione del parenchima epatico.

Esami di laboratorio

Il prelievo ematico è stato ottenuto mediante venopuntura eseguita da personale esperto al mattino dopo 12 ore di digiuno. I parametri valutati sono stati: glicemia (FBG), emoglobina glicosilata (HbA1c), colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi, aspartato-aminotransferasi (AST), alanino-aminotransferasi (ALT), gamma-glutamyltranspeptidasi (γ GT), fosfatasi alcalina, azotemia e creatinina. I dosaggi sono stati eseguiti attraverso metodi di laboratorio standard.

L'insulinemia basale è stata misurata mediante metodo radio-immunoenzimatico (ADVIA Insulin Ready Pack 100, Bayer Diagnostics, Italy), con coefficiente di variazione intra-intercampionario <5%. Il valore di LDL-colesterolo è stato calcolato attraverso la formula di Friedwald: colesterolo totale – HDL – (trigliceridi/5).

Il grado di insulino-resistenza è stato stimato attraverso calcolo dell'HOMA-IR, come precedentemente descritto (Mutsuda M, 1999). La presenza di SM è stata definita in base ai criteri NCEP/ATP-III modificati (Grundy SM, 2005).

Il diabete è stato diagnosticato in accordo ai criteri diagnostici ADA 2009 (America Diabetes Association, 2009).

Valutazione della NAFLD

La presenza e la severità della steatosi epatica sono state indagate attraverso valutazione ecografica. Tutti gli esami sono stati eseguiti dallo stesso operatore *blinded* per gli esami diagnostici del soggetto attraverso uno strumento Esaote Medica con sonda convex da 3.5 MHz.

La NAFLD è stata classificata in maniera semiquantitativa mediante applicazione di uno score (0-3) proporzionale alla severità della steatosi (0: assente, 1: lieve, 2: moderata, 3: severa), in base a criteri ecografici descritti e standardizzati che considerano l'ecogenicità del parenchima rispetto al rene destro, la penetrazione in profondità del fascio ultrasonoro e la visibilità delle strutture vascolari intraparenchimali.

È stato inoltre calcolato in tutta la popolazione studiata il Fatty Liver Index (FLI), un correlato clinico e metabolico di NAFLD e si ottiene applicando la seguente formula:

$$FLI = \left(e^{0.953 \cdot \log_e(\text{triglycerides}) + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \log_e(\text{ggt}) + 0.053 \cdot \text{waist circumference} - 15.745} \right) / \left(1 + e^{0.953 \cdot \log_e(\text{triglycerides}) + 0.139 \cdot \text{BMI} + 0.718 \cdot \log_e(\text{ggt}) + 0.053 \cdot \text{waist circumference} - 15.745} \right) * 100.$$

Il FLI è espresso con un numero compreso tra 0 e 100; un valore di FLI inferiore 30 esclude mentre maggiore di 60 predice la presenza di steatosi epatica con una sensibilità dell'87% e una specificità dell'86% (Bedogni G, 2006).

Misurazione della 25(OH)D₃

In tutti i partecipanti è stata misurata la concentrazione sierica di 25(OH)D₃, la forma circolante più stabile di questo ormone.

Al fine di minimizzare l'influenza della diversa inclinazione dei raggi solari durante l'anno sulla concentrazione ematica di 25(OH)D₃, i prelievi sono stati eseguiti durante la stessa stagione (Inverno). La misurazione della 25(OH)D₃ è stata eseguita con metodo colorimetrico (Laisson, DiaSorin) presso il laboratorio centralizzato su sieri centrifugati, separati e conservati per alcuni giorni a -25°C in frigoriferi di precisione dotati di termometro.

A tutti i soggetti è stato illustrato dettagliatamente il consenso informato, che è stato firmato da ogni paziente prima dell'arruolamento nello studio.

Il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico del Policlinico Umberto I, Sapienza Università di Roma, e lo studio è stato condotto in accordo con i principi della Dichiarazione di Helsinki.

Statistica

Tutte le analisi statistiche sono state condotte attraverso l'impiego di software statistici (SPSS versione 17 e EpiInfo 3.5). Le variabili non distribuite normalmente hanno subito una trasformazione logaritmica (\log_{10}) prima di essere inserite nelle analisi. Tutte le variabili sono state inserite nel testo e nelle tabelle con il valore medio \pm deviazione standard.

Il confronto tra le medie di due gruppi indipendenti è stato eseguito con il test T di Student per le variabili continue e il test del χ^2 per le variabili categoriche. Sono state utilizzate le analisi di regressione multivariata logistica e ordinale per valutare la correlazione esistente tra presenza e grado di NAFLD e le variabili predittive, in accordo con le rispettive assunzioni. Il valore di FLI e la concentrazione di 25(OH)D₃ sono stati inseriti nelle analisi come variabili continue.

Per indagare la relazione tra FLI e le variabili cliniche e biochimiche di predizione, è stato costruito un modello di regressione lineare multivariata.

Per tutte le analisi, valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi, con un intervallo di confidenza del 95%.

III.3 Risultati

Dei 262 soggetti consecutivi che sottoposti a ecografia epatica, 162 (61.8%) sono risultati affetti da NAFLD (43% lieve, 39.2% moderata e 17.8% severa) mentre 100 non evidenziavano steatosi epatica né altre epatopatie.

I pazienti affetti da steatosi epatica differivano significativamente dai soggetti senza steatosi epatica per numerosi parametri clinici e biochimici, tra cui: BMI: 31.3 ± 5.4 vs 25.8 ± 5.4 kg/m², $p < 0.001$; circonferenza vita: 105.9 ± 12.6 vs 90.2 ± 18.1 cm, $p < 0.001$; colesterolo HDL: 46.7 ± 10.9 vs 56.1 ± 12.2 mg/dl, $p < 0.001$; trigliceridi: 172.4 ± 95.1 vs 103.1 ± 47.6 mg/dl, $p < 0.001$. Le caratteristiche cliniche e biochimiche del campione studiato, in relazione alla presenza o assenza di NAFLD, sono illustrate nella tabella 1.

	NAFLD + (n=162)	NAFLD - (n=100)	P-value
Età (anni)	52.07±8.18	49.81±7.7	n.s.
Sesso^ (M/F)	89/73	51/49	n.s.
BMI (kg/m ²)	31.36±5.49	25.87±5.1	<0.001
Circonferenza vita (cm)	105.94±12.68	90.26±18.10	<0.001
SBP (mmHg)	132.90±14.63	120.12±18.74	<0.001
DBP (mHg)	81.20±9.83	77.23±7.93	0.005
HOMA-IR	10.42±15.44	3.62±2.89	<0.001
FBG (mg/dl)	114.8±27.9	100.4±28.6	<0.001
Colesterolo totale (mg/dl)	195.76±42.37	198.85±40.18	n.s.
Colesterolo HDL (mg/dl)	46.76±10.89	56.34±12.29	<0.001
Colesterolo LDL (mg/dl)	116.97±43.39	119.41±41.19	n.s.
Trigliceridi (mg/dl)	172.5±95.2	103.1±47.6	<0.001
AST (IU/l)	26.5±15.4	18.9±5.6	<0.001
ALT (IU/l)	37.7±24.6	20.4±10	<0.001
GGT (IU/l)	45.5±27.4	20.3±14.7	<0.001
Fosfatasi alcalina (IU/l)	73.3±27.4	61.7±20.9	0.02
25(OH)D ₃ (ng/ml)	14.8±9.2	20.5±9.7	<0.001
FLI	71.66±25.25	30.25±28.93	<0.001
SM^ (%)	73	22.7	<0.001
T2D^ (%)	39	13	<0.001
Severità NAFLD	I= 43% II= 39.2% III= 17.8%	-	

Tabella 1. Caratteristiche della popolazione in relazione alla presenza (+) o assenza (-) di NAFLD. Test T di Student, ^ Test del χ^2 .

NAFLD e 25(OH) vitamina D

Nei pazienti con NAFLD sono stati riscontrati livelli sierici di 25(OH)D₃ significativamente ridotti rispetto ai soggetti senza steatosi epatica; questi ultimi riportavano, comunque, valori medi appena al di sopra della soglia di 20 ng/ml stabilita per un bilancio sufficiente di vitamina D nell'organismo umano (14.8 ± 9.2 vs 20.5 ± 9.7 ng/ml, p<0.001). L'associazione tra presenza di NAFLD e ridotti livelli sierici di 25(OH)D₃ era indipendente da sesso, età, trigliceridi, HDL e FBG nel modello di regressione logistica multivariata (p<0.005) (Tab. 2a).

Term	Odds Ratio	95% C.I.		P-Value
Sesso	1.2798	0.5414	3.0250	0.5741
Età	1.0392	0.9901	1.0907	0.1197
FBG	1.0154	0.9972	1.0339	0.0969
HDL	0.9904	0.9580	1.0239	0.5713
Trigliceridi	1.0104	1.0030	1.0178	0.0059
25(OH)D ₃	0.9331	0.8889	0.9794	0.0051

Tabella 2a. Regressione logistica multivariata. NAFLD variabile dipendente. P-value <0.05 statisticamente significativi. Likelihood Ratio <0.001.

Nell'ambito dell'intera popolazione sono stati, successivamente, identificati 70 individui normopeso (n=70, BMI < 25 kg/m²). La prevalenza di NAFLD in questo sottogruppo era del 13.7% e i soggetti con steatosi epatica avevano valori sierici di 25(OH)D₃ significativamente ridotti rispetto ai livelli riscontrati negli individui normopeso senza NAFLD (14.6±9.7 vs 23.2±8.9 ng/ml, p<0.01).

L'analisi di regressione logistica multipla ha dimostrato che l'associazione tra la presenza di NAFLD e bassi livelli sierici di 25(OH)D₃ nella popolazione normopeso era statisticamente significativa, indipendentemente da sesso, età, FBG, trigliceridi e BMI, come mostrato nella tabella 2b.

Term	Odds Ratio	95% C.I.		P-Value
Sesso	0.8782	0.1256	6.1418	0.8959
Età	0.9696	0.8384	1.1212	0.6767
FBG	1.0050	0.9556	1.0570	0.8449
BMI	1.5312	0.6950	3.3738	0.2904
Trigliceridi	0.9945	0.9723	1.0172	0.6304
25(OH)D ₃	0.8601	0.7576	0.9764	0.0199

Tabella 2b. Analisi di regressione logistica multipla nel sotto-campione normopeso. NAFLD variabile dipendente. Likelihood Ratio <0.001.

Inoltre, il modello di regressione ordinale applicato all'intera popolazione dello studio ha dimostrato la presenza di una associazione statisticamente significativa tra il grado di NAFLD, la concentrazione sierica di 25(OH) vitamina D, le componenti della MS e il livello di insulino-resistenza, quantificato mediante calcolo dell'HOMA-IR (Tabella 3).

	SE	P-value
25(OH) vitamina D	0.01	0.001
Età	0.01	<0.001
Sesso	0.18	n.s.
BMI	0.03	<0.001
Circonferenza vita	0.01	<0.001
FBG	1.5	<0.001
Colesterolo totale	0.003	n.s.
HDL	0.01	<0.001
LDL	0.003	n.s.
Trigliceridi	0.7	<0.001
HOMA-IR	0.8	<0.001
Insulinemia basale	0.6	<0.001

Tabella 3. Analisi di regressione ordinale dei fattori associati al grado di steatosi epatica. SE, errore standard di β . P-value < 0.05 considerati significativi. HOMA-IR, FBG e trigliceridi considerati come \log_{10} nell'analisi statistica.

Successivamente, il campione è stato suddiviso in quartili in relazione alla concentrazione sierica di 25(OH) vitamina D ed è stata osservata un trend altamente significativo di aumentata prevalenza di NAFLD, SM e sue componenti nei quartili più bassi di vitamina D. L'appartenenza al I quartile di 25(OH) vitamina D aveva un Odds Ratio per la presenza di NAFLD pari a 4.71 (CI 2.15-10.3, $p < 0.001$) rispetto al IV quartile. La tabella 4 illustra le caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione in relazione al quartile di 25(OH) vitamina D e i risultati del test di confronto tra i gruppi (test di tendenza inter-quartilico).

	I Quartile (n=51)	II Quartile (n=66)	III Quartile (n=62)	IV Quartile (n=83)	P-value
Età (anni)	55.93±9.34	52.1±10.7	52.2±11.2	52.24±9.45	n.s.
Sesso^ (M/F)	30/21	32/34	33/29	37/46	n.s.
BMI (kg/m ²)	30.99±6.96	29.5±5.8	27.04±4	26.25±4.38	<0.001
Circonferenza vita (cm)	105.27±16.82	103.6±14.8	95.01±19.2	91.08±16.72	0.001
FBG (mg/dl)	111.5±26.1	106.3±23.7	107.7±30.2	103.2±31.1	n.s.
Colesterolo totale (mg/dl)	206.05±49.46	201.3±41.1	197.5±35.8	192.07±40.95	n.s.
Colesterolo LDL (mg/dl)	122.73±44.62	126.8±37.5	123.6±33.2	109.15±46.07	n.s.
Colesterolo HDL (mg/dl)	51.88±16.36	52.5±12.7	52.5±12.2	52.71±13.82	n.s.
Trigliceridi (mg/dl)	178.8±98.7	124.8±84.7	124.6±75	115.6±60.8	0.001
HOMA-IR	10.01±7.58	5.15±4.3	4.3±9.8	5.32±7.86	0.03
AST (IU/l)	21.1±7.4	22.1±11.1	25.6±10.7	21.8±11.01	n.s.
ALT (IU/l)	25.5±14	28.8±16.6	28.6±21.7	26.7±19.2	n.s.
FLI	71.77±26.83	51.9±33.3	45.02±35.9	32.04±29.79	<0.001
NAFLD^ (%)	68.3	56.1	50	37.3	0.01
MS^ (%)	72.5	43.9	35.5	33.3	<0.001
T2D^ (%)	36.2	22.7	24.2	25.3	n.s.

Tabella 4. Caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione in relazione al quartile di 25(OH) vitamina D.

FLI, steatosi epatica e 25(OH) vitamina D

I soggetti affetti da NAFLD avevano un FLI medio significativamente maggiore rispetto ai soggetti senza steatosi (71.6 ± 25.2 vs 30.2 ± 28.9 , $p < 0.0001$).

La correlazione tra il riscontro ecografico di steatosi epatica e il FLI è risultata estremamente significativa, sia considerando la presenza di NAFLD come variabile dicotomica ($r=0.61$, $p < 0.001$), sia valutandola in relazione al grado di severità della steatosi (0-3) ($r= 0.44$, $p < 0.001$). Il FLI correlava inversamente con la 25(OH) vitamina D in maniera indipendente da sesso, età e HOMA-IR (Unstandardized β coefficient: -1.6, standardized β coefficient: -0.4, $p < 0.007$).

Diabete di tipo 2 e 25(OH)D₃

La nostra popolazione è stata, inoltre, studiata in relazione alla presenza di diabete mellito di tipo 2. I soggetti diabetici avevano livelli sierici di 25(OH)D₃ confrontabili rispetto ai soggetti

non diabetici (17 ± 10.2 ng/ml vs 17.5 ± 8.8 ng/ml ng/ml, $p=n.s.$); la regressione logistica applicata all'intera popolazione ha confermato che la concentrazione sierica di 25(OH)D₃ non è un determinante di diabete di tipo 2 nel presente studio ($p=n.s.$).

III.4 Conclusioni

Questo studio ha messo in evidenza la presenza di ridotti livelli sierici di 25(OH)D₃ nei pazienti affetti da NAFLD rispetto ai soggetti senza steatosi epatica confrontabili per sesso ed età, indipendentemente dalla presenza e dal numero di componenti della SM e dalla diagnosi di diabete mellito di tipo 2. Allo scopo di identificare in maniera più sensibile i soggetti con NAFLD e di quantificare l'entità della steatosi epatica, è stato calcolato il FLI in tutta la popolazione in studio. Il FLI correlava strettamente con la diagnosi ecografica di NAFLD e con il grado di severità stabilito ecograficamente e, inoltre, era inversamente associato alla concentrazione sierica di 25(OH)D₃ indipendentemente da sesso, età e HOMA-IR. A causa della possibile interferenza della massa grassa sul dosaggio della vitamina D, gli indici antropometrici non sono stati inseriti nei modelli di analisi statistica applicati all'intera popolazione. Una subanalisi condotta esclusivamente nei soggetti normopeso ha invece dimostrato che bassi livelli di 25(OH)D₃ sono predittori di steatosi epatica in maniera indipendente dai parametri antropometrici e dalle singole componenti della SM.

IV. Ipovitaminosi D, obesità patologica e sindrome metabolica

IV.1 Razionale e scopi

È noto che la vitamina D, grazie alla sua natura lipofila, è soggetta ad accumulo selettivo nel tessuto adiposo, sia viscerale che sottocutaneo. Questa caratteristica biochimica può influenzare significativamente la biodisponibilità della 25(OH)D₃ e, verosimilmente, la sua efficacia biologica (vedi Introduzione, § II.1). Diversi lavori hanno evidenziato un'associazione tra ipovitaminosi D, presenza di SM e insulino-resistenza (vedi Introduzione, § II.2). Scopo di questo studio è stato indagare la relazione che intercorre tra i livelli sierici di 25(OH)D₃, obesità e presenza di SM in una popolazione di soggetti obesi.

IV.2 Materiali e Metodi

Popolazione

Per questo studio sono stati arruolati 61 pazienti obesi affetti da SM e 46 soggetti senza SM confrontabili con il primo gruppo per sesso, età, BMI, circonferenza vita e percentuale di massa grassa, tutti afferenti presso il Day-Hospital di Endocrinologia e Malattie Metaboliche, Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche, Umberto I Policlinico di Roma. I criteri di inclusione sono stati: età compresa tra 18 e 65 anni, razza caucasica, BMI ≥ 30 kg/m², anamnesi negativa per neoplasie, insufficienza epatica, insufficienza o litiasi renale, ipo o iperparatiroidismo primitivo, sarcoidosi, pregressi interventi di chirurgia bariatrica,

obesità da sindromi cromosomiche, supplementazione con calcio e/o vitamina D, accettazione consapevole del consenso informato.

Tutti i partecipanti sono stati sottoposti ad anamnesi, esame obiettivo e prelievo venoso a digiuno. Sono stati misurati: glicemia (mg/dl), insulinemia basale (IU/ml) emoglobina glicosilata (%), colesterolo totale (mg/dl), HDL (mg/dl), LDL (mg/dl), trigliceridi (mg/dl), calcemia (mg/dl), fosforemia (mg/dl), calcio ionizzato (mmol/l), PTH (pg/ml).

Ai fini di ottenere una completa caratterizzazione metabolica, tutti i soggetti senza una diagnosi precedentemente formulata di diabete mellito sono stati sottoposti a curva da carico orale standard (oral glucose tolerance test, OGTT) con somministrazione di 75 gr. di glucosio e misurazione di glicemia ed insulinemia ai tempi 0, 30, 60 90 e 120 minuti.

Misurazione della 25(OH)D₃

La misurazione delle concentrazioni sieriche di 25(OH)D₃ è stata effettuata con metodo precedentemente descritto (vedi § III.2). Al fine di evitare l'introduzione di un bias legato alla diversa inclinazione dei raggi solari durante i diversi periodi dell'anno, e quindi alla differente possibilità di produrre vitamina D sulla superficie cutanea, l'arruolamento dei pazienti è avvenuto durante la sola stagione invernale.

Misurazioni antropometriche

Per valutare la massa corporea sono state effettuate le seguenti misurazioni:

- Altezza (m), misurata con uno statimetro calibrato in centimetri
- Peso (Kg), ottenuto per mezzo di una bilancia impedenziometrica di precisione (approssimazione di 0.2 Kg) dopo 12 ore di digiuno e senza aver assunto liquidi nelle due ore precedenti, senza abiti e/o oggetti metallici (Figura 1)



Figura 1. Impedenziometro. Attraverso 4 elettrodi posti sulla pedana metallica dello strumento, viene trasmesso al paziente un impulso di corrente innocuo per i tessuti di 800 μ A alla frequenza di 50kHz. La metodica è basata sul principio che i tessuti biologici si comportano come conduttori, semiconduttori o dielettrici (isolanti). Le soluzioni elettrolitiche intra- ed extra-cellulari dei tessuti magri sono ottimi conduttori, mentre osso e grasso sono sostanze dielettriche e come tali non vengono attraversati dalle correnti. Il valore di impedenza ottenuto viene elaborato dal software interno rilasciando come output la misura della massa grassa e della massa magra (massa non grassa e H₂O). Lo strumento fornisce i cut-off di normalità standardizzati per sesso, età e tipo di corporatura (atletica o normale).

- Circonferenza vita, misurata in posizione eretta con addome rilassato, braccia lungo il tronco e piedi uniti, attraverso metro anelastico posizionato in corrispondenza del punto di mezzo tra l'estremità superiore della cresta iliaca ed il margine inferiore dell'arcata costale nella parte laterale dell'addome.
- BMI, rapporto tra il peso in Kg e l'altezza in m².

Valutazione della SM e dell'insulino-resistenza

La presenza di SM è stata diagnosticata in base ai criteri NCEP/ATP-III modificati (Grundy SM, 2005), la diagnosi di diabete mellito è stata effettuata in accordi con i criteri ADA 2010 (America Diabetes Associatio, 2009).

Il grado di insulino-resistenza è stato stimato nella nostra popolazione attraverso indici calcolati su parametri statici e dinamici (ottenuti durante l'esecuzione di OGTT).

Indici statici

- HOMA-IR (Modello di valutazione omeostatico)
 $G_0 \times I_0 / 22.5$
- QUICKI (Quantitative Insulin-sensitivity Check Index)
 $1 / \log G_0 + \log I_0$

G_0 = glicemia a digiuno (mg/dl), I_0 = insulinemia basale (μ U/ml)

Indici derivati dall'OGTT

- $ISI_{Matusuda}$ (Insulin Sensitivity Index)
 $10.000 \sqrt{(G_0 \times I_0) \times (G_{media} \times I_{media})}$

G_0 = glicemia a digiuno (mg/dl), I_0 = insulinemia basale (μ U/ml)

G_{media} = glicemia media durante OGTT (0, 30, 60, 90, 120 minuti), I_{media} = insulinemia media durante OGTT (0, 30, 60, 90, 120 minuti)

Statistica

Tutte le analisi sono state condotte attraverso l'impiego di SPSS s.a.s. versione 17.0. Le variabili continue sono state inserite nel testo e nelle tabelle come media \pm deviazione standard (DS). Le variabili non distribuite normalmente hanno subito trasformazione logaritmica (\log_{10}) prima dell'analisi statistica. Il confronto tra le medie di due gruppi indipendenti è stato effettuato attraverso test T di Student e del chi-quadro, come appropriato. Le correlazioni sono state valutate attraverso il coefficiente di Pearson. I valori di $p < 0.05$ sono considerati statisticamente significativi, con un intervallo di confidenza del 95%.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico locale ed è stato condotto in accordo con i principi della Dichiarazione di Helsinki.

IV.3 Risultati

Le caratteristiche del campione totale sono illustrate nella tabella 1.

	SM- (n= 46)	SM+ (n= 61)	p-value [°]
Sesso (M/F)	25/21	34/27	n.s. [^]
Età (anni)	41.8±11.5	45.3±13.3	n.s.
BMI (kg/m ²)	41.6±6.5	43.1±8.3	n.s.
Circonferenza vita (cm)	122.5±17.2	125.4±14.9	n.s.
Circonferenza fianchi (cm)	138.8±14.9	130.9±13.7	n.s.
Vita/Fianchi	0.86±0.1	0.96±0.1	0.01
Massa grassa (%)	47.3±5.3	44.8±8.1	n.s.
PAS (mmHg)	121.4±14.0	133.9±17.3	<0.001
PAD (mmHg)	80.1±8.7	84.9±9.5	<0.001
Colesterolo totale (mg/dl)	202.2±34.9	196.9±36.1	n.s.
HDL (mg/dl)	54.2±13.6	44.3±11.3	<0.001
LDL (mg/dl)	130.1±33.7	122.1±31.5	n.s.
Trigliceridi (mg/dl)	98.1±34.6	153.4±68.9	n.s.
Glicemia (mg/dl)	95.9±16.3	122.2±42.9	<0.001
HbA1c (%)	5.6±0.6	6.2±1.3	0.007
Insulina (μU/ml)	28.7±15.6	40.8±22.6	<0.001
HOMA-IR	6.8±4.1	10.9±7.9	<0.001
ISI	2.3±1.6	1.6±6.2	0.05
QUICK	0.3±0.03	0.28±0.02	n.s.
AST (U/l)	21.5±8.7	27.5±17.8	0.02

Tabella 1 - Caratteristiche della popolazione in relazione alla presenza (SM+) o assenza (SM-) di sindrome metabolica. °Test T di Student, ^Test chi-quadro.

I pazienti con SM mostravano una concentrazione ematica di 25(OH)D₃ significativamente inferiore rispetto al gruppo di soggetti senza SM (14.9±6.2 ng/ml vs 18.9±8.2 ng/ml, p<0.007).

Come atteso, il gruppo di pazienti con SM ha riportato valori di pressione arteriosa sistolica, glicemia, HbA1c e insulinemia significativamente superiori e una colesterolemia HDL media inferiore rispetto alla popolazione obesa senza SM. Inoltre, in presenza di SM sono stati riscontrati valori di transaminasemia significativamente aumentati rispetto a quelli riscontrati nel gruppo di soggetti non dismetabolici, sebbene in entrambi i gruppi questi rientrassero nei limiti della norma.

All'analisi univariata, la concentrazione ematica di 25(OH)D₃ correlava inversamente con la glicemia (Coefficiente di Pearson: -0.26, p<0.007) il fosfato sierico (Coefficiente di Pearson: -0.21, p<0.03) e il PTH sierico (Coefficiente di Pearson: -0.28, p<0.003) mentre il suo valore non correlava con nessun parametro antropometrico misurato, né con gli indici di insulino-resistenza calcolati. L'analisi di regressione lineare multivariata ha mostrato che bassi livelli sierici di 25(OH)D₃ si associavano alla presenza di SM indipendentemente da sesso, età, diagnosi di diabete tipo 2 e concentrazioni ematiche di PTH, come mostra la tabella 2.

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
SM	-4,316	1,547	-,290	-2,790	,006
Età	,015	,064	,026	,243	,808
Sesso	,250	1,615	,016	,155	,877
PTH	-10,693	3,658	-,288	-2,923	,004
T2D	,299	1,806	,018	,166	,869

a. Dependent Variable: 25(OH) vitamina D

Tabella 2. Analisi di regressione lineare multivariata.

La popolazione in esame è stata quindi suddivisa in quartili in relazione alla concentrazione serica di 25(OH)D₃. Il gruppo di soggetti appartenenti al quartile inferiore di vitamina D mostrava una prevalenza di SM e diabete significativamente superiore rispetto a quella riportata nei soggetti del IV quartile. La tabella 3 illustra i parametri che differivano significativamente nel confronto inter-quartilico.

	I quartile	IV quartile	P- value
Trigliceridi (mg/dl)	151.8±71	115.9±31.4	0.05
Glicemia (mg/dl)	129.3±48.8	102.3±24	0.01
PTH (pg/ml)	58.3±56.9	36.1±11.9	0.05
Fosfato (mg/dl)	3.5±0.6	3.2±0.4	0.02
SM (%)	73.1	40.7	0.01*
DM (%)	37.0	25.0	0.02*

Tabella 3 . Caratteristiche della popolazione in relazione al quartile di 25(OH)D₃. Test T di Student. * Test chi-quadro.

IV.4 Conclusioni

La concentrazione sierica di vitamina D si è dimostrata significativamente inferiore nei pazienti obesi affetti da SM rispetto a quella riscontrata in soggetti senza SM e confrontabili per sesso, età, BMI, circonferenza vita e percentuale di massa grassa valutata con metodo impedenziometrico. Dall'analisi effettuata in funzione della concentrazione sierica di 25(OH)D₃ è emerso che i soggetti appartenenti al quartile inferiore di vitamina D hanno valori di trigliceridi, glicemia, fosfato, PTH e una prevalenza di sindrome metabolica e diabete di tipo 2 significativamente superiori rispetto ai pazienti appartenenti al IV quartile.

In base ai risultati ottenuti da questo studio si può affermare che esiste una relazione tra ipovitaminosi D e presenza di SM indipendente dalla massa corporea e, in particolare, dalla percentuale di massa grassa. La compartimentalizzazione della vitamina D nel tessuto adiposo, quindi, non sarebbe l'unica spiegazione del riscontro di ridotti livelli sierici di 25(OH)D₃ nei soggetti dismetabolici e della sua correlazione con gli indici di massa corporea, come ipotizzato da studi precedenti. Nonostante il disegno trasversale dello studio non permetta di evidenziare l'esistenza di una causalità tra il riscontro di ipovitaminosi D e la presenza di SM, l'attività biologica insulino-sensibilizzante della vitamina D suggerisce che una carente concentrazione sierica di 25(OH)D₃, indipendentemente dal volume di distribuzione della molecola, potrebbe essere una concausa di insulino-resistenza, e potrebbe quindi spiegare il riscontro di un deficit di vitamina D nei soggetti affetti da sindrome metabolica.

V. Ipovitaminosi D ed epatopatie a diversa etiologia

V.1 Razionale e scopi

Diversi dati in letteratura suggeriscono l'esistenza di una associazione diretta tra i livelli sierici di 25(OH)D₃ e la presenza, severità e prognosi di epatopatie di diversa etiologia (vedi Introduzione § II.4.1 e II.4.2). La vitamina D per svolgere le sue attività biologiche necessita di due successivi processi di idrossilazione, il primo in posizione C25 e il secondo il posizione C1 (vedi Introduzione § I.2). La 25-idrossilazione avviene esclusivamente a livello epatico ad opera di due citocromi con sedi, specificità e affinità differenti, il CYP27A1 e il CYP2R1. Mentre studi genetici hanno dimostrato che il polimorfismo del CYP2R1 è associato ai livelli sierici di vitamina D e alla presenza di patologie legate alla ipovitaminosi D nell'uomo (Holick MF, 2004), in letteratura esistono scarsissime evidenze sull'espressione epatica di questi citocromi in corso di epatopatia. È noto che la vitamina D, una volta convertita nella sua forma biologicamente attiva di-idrossilata, esercita, tra le altre, azioni antiproliferative e immunoregatorie attraverso il legame con lo specifico recettore VDR (vedi Introduzione § I.3). Allo stato attuale, pochi studi hanno indagato l'espressione del VDR in sede epatica.

È stata dimostrata l'espressione dell'mRNA del VDR nel fegato di ratto (Segura C, 1999), prevalentemente in cellule epiteliali non-parenchimali (Kupffer e cellule stellate) e biliari (Gascon-Barré M, 2003), mentre l'espressione di VDR nel fegato umano è stata riportata in un solo studio, su material proveniente da fegato sano (Berger U, 1988).

In base alle nostre conoscenze, non sono presenti dati in letteratura sull'espressione istologica del VDR in corso di epatopatia.

Scopo di questa parte del progetto è stato, pertanto, indagare la relazione che intercorre tra l'espressione dei citocromi CYP2R1, CYP27A1 e del VDR nelle diverse popolazioni cellulari epatiche, la severità del quadro istologico e la concentrazione sierica di 25(OH)D₃ in due differenti popolazioni di pazienti affetti rispettivamente da NASH e da epatite HCV-correlata.

V.2 Materiali e Metodi

Popolazione

Per questo studio sono stati reclutati 25 individui affetti da NASH e 36 pazienti con epatite HCV-correlata tra tutti i soggetti afferenti presso il Day-Hospital di Epatologia, Università Campus Bio-Medico di Roma, nel periodo compreso tra Ottobre 2009 e Giugno 2010 per essere sottoposti a biopsia epatica a scopo diagnostico o dopo terapia con PEG-interferon (epatite cronica da HCV). I criteri di esclusione applicati sono stati: epatopatie di etiologia differente; presenza di cirrosi epatica avanzata (Child-Pugh B e C); presenza o storia di neoplasie; malattie infiammatorie intestinali; terapie con farmaci che interagiscono con il metabolismo della vitamina D₃, inclusi supplementi polivitaminici.

Esame clinico e indagini ematochimiche

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad anamnesi ed esame obiettivo. I parametri antropometrici valutati sono stati peso, altezza e circonferenza vita e Indice di Massa Corporea (BMI, Kg/m²). Il prelievo ematico è stato ottenuto mediante venopuntura effettuata il mattino dell'esecuzione della biopsia epatica dopo 12 ore di digiuno del paziente. I parametri valutati sono stati: glicemia (FBG), colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi, aspartato-aminotransferasi (AST), alanino-aminotransferasi (ALT), gamma-glutamyl-

transpeptidasi (γ GT), fosfatasi alcalina, bilirubina totale, bilirubina diretta, azotemia e creatinina. I dosaggi sono stati eseguiti attraverso metodi di laboratorio standard.

Nei pazienti affetti da HCV è stata valutata la presenza di HCV-RNA attraverso *polymerase chain reaction* qualitativa. Nei campioni risultati positivi la quantificazione di HCV-RNA è stata effettuata mediante saggio Versant HCV RNA 3.0 bDNA (Bayer).

La misurazione delle concentrazioni sieriche di $25(\text{OH})\text{D}_3$ è stata realizzata secondo metodiche descritte in precedenza (vedi § III.2).

Biopsia epatica

Le biopsie epatiche sono state eseguite attraverso metodica percutanea eco-assistita dallo stesso operatore specialista epatologo. Per i nostri scopi sperimentali è stata utilizzata solamente la parte di frustolo epatico in esubero rispetto alla quantità necessaria per la diagnosi clinica. I frustoli ottenuti dalle biopsie sono stati immediatamente fissati in formalina (soluzione di formaldeide al 10%) e trasportati a un unico patologo di riferimento. Sono state ritenute valutabili ai fini sperimentali soltanto sezioni contenenti almeno 3 spazi portalì.

L'entità della steatosi è stata quantificata attraverso lo scoring system proposto da Brunt (grado 1: <33% epatociti coinvolti, grado 2: 33-66% epatociti coinvolti, grado 3: >66% epatociti coinvolti). È stato inoltre calcolato il NAS score totale, un parametro quantitativo determinato da: steatosi (0-3), infiammazione lobulare (0-2), *ballooning* epatocellulare (0-2) e fibrosi (0-4) (Kleiner DE, 2005).

Per la valutazione dell'infiammazione nell'intera popolazione è stato applicato il sistema di score secondo Ishak A e D (Ishak K, 1995) (Tabella 1).

GRADING (infiammazione)

Score A - Epatite periportale o perisetale (piecemeal necrosis)

0 Assente

1 Lieve (focale,alcuni spazi portalì)

2 Lieve/moderata (focale, la maggior parte degli spazi portalì)

3 Moderata (continua intorno a < 50% dei tratti o setti)

4 Severa (continua intorno a > 50% dei tratti o setti)

Score D - Infiammazione portale

0 Nessuna

1 Lieve, alcune o tutte le aree portalì

2 Moderata, alcune o tutte le aree portalì

3 Moderata/marcata in tutte le aree portalì

Tabella 1. Valutazione istologica secondo Ishak.

Valutazione dell'espressione del VDR, CYP2R1 e CYP27A1

Le espressioni cellulari del VDR (Vitamin D Receptor antibody - ChIP Grade, Abcam), del CYP2R1 (CYP2R1 Antibody, AbCam) e del CYP27A1 (CYP27A1 Antibody, AbCam) sono state valutate mediante studio immunoistochimico. Frammenti di fegato sono stati fissati in formalina tamponata per 2-4 h e successivamente inclusi in blocchi di paraffina con punto di fusione di 55-57 °C. Sezioni di 3-4 µm sono state quindi ricavate dai blocchi e sottoposte a colorazione ematossilina-eosina e tricomica di Masson. Per gli studi di immunoistochimica le sezioni sono state montate su vetrini rivestiti con poli(L-lisina) 0.1%. Dopo deparaffinazione e blocco della perossidasi endogena (perossido di idrogeno 2.5% per 30 minuti), la biotina endogena è stata bloccata attraverso Biotin Blocking System (Dako, Milano, Italia) secondo le istruzioni ricevute dal venditore. Le sezioni sono state quindi lavate in soluzione salina fosfato-tamponata (PBS) per tre volte. Gli anticorpi anti-VDR (diluizione 1:100), anti-CYP2R1 (diluizione 1:50) e anti-CYP27A1 (diluizione 1:400) sono stati impiegati come anticorpi primari. Le sezioni con VDR sono state incubate per 1 ora, i campioni con CYP2R1 e CYP27A1 per tutta la notte, tutti previo smascheramento termindotto (98°C) con tampone citrato a pH 6 per 30 minuti.

Dopo tre lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate per 30 minuti con l'apposito anticorpo secondario biotinilato (marcato con streptavidina-biotina; Dako). I controlli negativi sono stati effettuati con antisiero mouse normale. Le sezioni sono state processate con 3,3'-diaminobenzidina e colorate con ematossilina. Le colorazioni e l'interpretazione dei risultati sono state condotte dallo specialista anatomo-patologo di riferimento, *blinded* per i dati clinici dei pazienti esaminati.

- **VDR**

La valutazione dell'espressione del VDR è stata realizzata sulle diverse linee cellulari presenti nel fegato:

Colangiociti: percentuale dei colangiociti VDR positivi (VDR+) sul totale dei colangiociti presenti negli spazi portali;

Epatociti: positività per il VDR nel citoplasma e nucleo degli epatociti. Tale positività è stata quantificata mediante uno score da 0 a 3 (assenza di colorazione, lieve, moderata e spiccata positività per il VDR).

Cellule infiammatorie: presenza/assenza di un infiltrato infiammatorio; valutazione della positività per il VDR sulle cellule infiammatorie (citoplasma e nucleo) mediante uno score da 0 a 3 (assenza di colorazione, lieve, moderata e spiccata positività per il VDR).

- **CYP2R1, CYP27A1**

L'espressione delle 25-idrossilasi epatiche (CYP2R1 e CYP27A1) è stata valutata sugli epatociti attraverso l'applicazione di uno score semi-quantitativo da 0 a 3 (assenza di colorazione; lieve, moderata e spiccata positività per il citocromo).

Risultati

NASH e 25(OH) D₃

La popolazione studiata presentava una concentrazione media di vitamina D sierica pari a 20.9±12.3 ng/ml, inferiore, quindi, ai livelli raccomandati (>30 ng/ml). Il livello sierico di

25(OH)D₃ era inversamente correlato con il danno da “ballooning” intraepatocitario (Coeff. Spearman 0.84, $p < 0.005$) ma non con il grado di steatosi epatica.

Nella popolazione con NASH la presenza di una maggior percentuale di colangiociti positivi per l'espressione del VDR correlava con un minor grado di steatosi (Coeff. Spearman 0.6, $p < 0.02$), di infiammazione lobulare (Coeff. Spearman 0.6, $p < 0.01$) e, in definitiva, con un NAS score inferiore (Coeff. Spearman 0.54, $p < 0.04$). Nei soggetti con spiccata VDR+ nei colangiociti era presente un'intensa VDR+ anche a carico degli epatociti (Coeff. Spearman 0.6, $p < 0.024$).

In presenza di epatociti fortemente positivi per VDR (più del 50% delle cellule valutabili) è stato evidenziato un minore grado di steato-epatite quantificata attraverso il NAS score (Coeff. Spearman 0.56, $p < 0.03$).

(Figure 1 e 2).

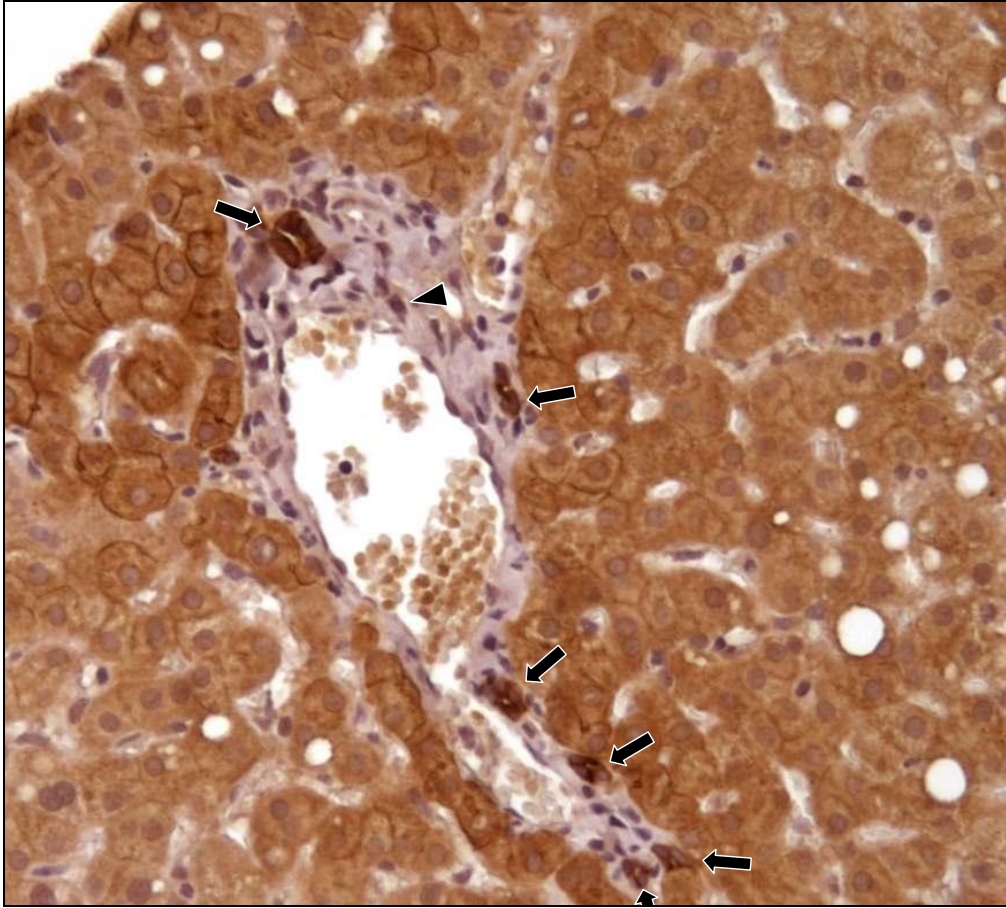


Figura 1. Paziente affetto da NASH, NAS score 1. Colorazione per VDR (infrandimento 20x1). Le frecce nere indicano i colangiociti, che appaiono fortemente VDR+. L'infiltrato infiammatorio è scarso. Il triangolo indica una cellula infiammatoria. Notare la spccata positività citoplasmatica e nucleare per VDR degli epatociti.

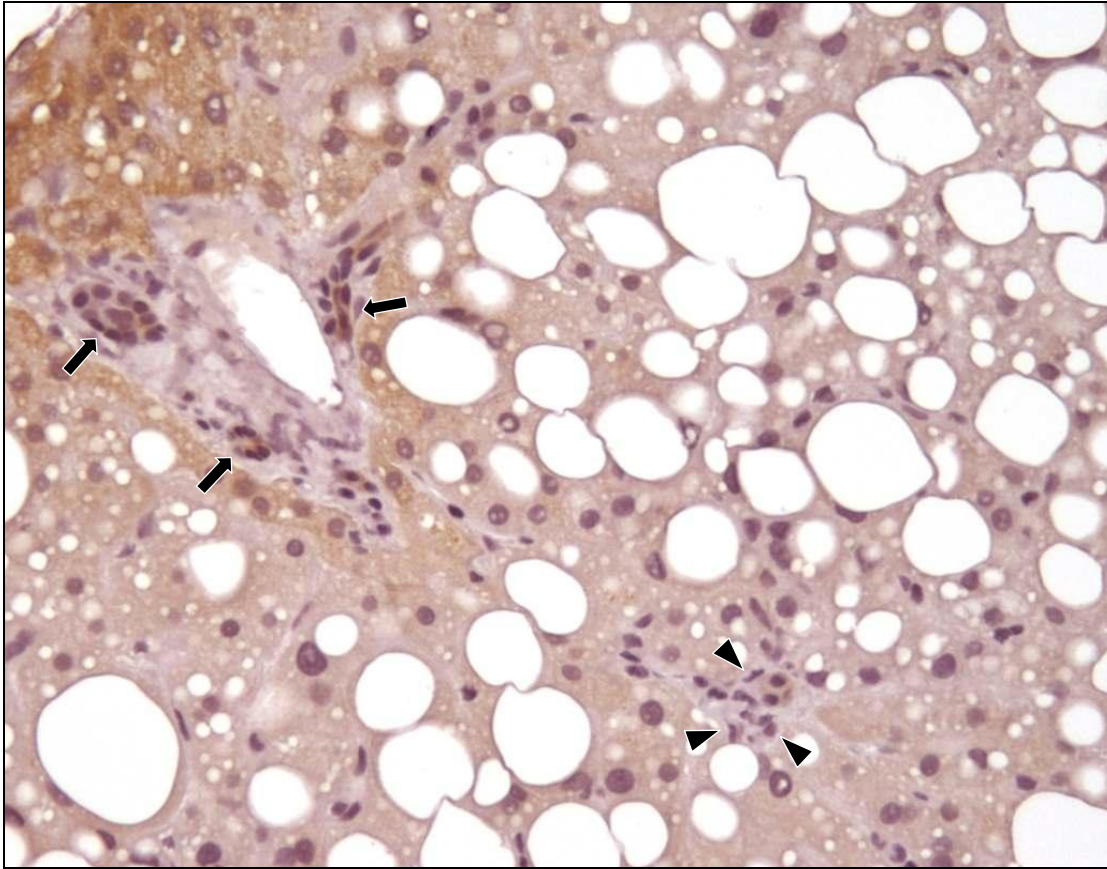


Figura 2. Paziente affetto da NASH, NAS score 4. Colorazione per VDR (infrandimento 20x1). I colangiociti (frecche nere) e le cellule infiammatorie sono scarsamente positive per il VDR.

Mentre l'espressione delle 25-idrossilasi non correlava con i livelli sierici di 25(OH)D₃, nei soggetti con infiltrato infiammatorio VDR+ era riscontrabile una maggiore positività per l'espressione di CYP2R1.

HCV e 25(OH) D₃

Nella popolazione studiata le concentrazioni sieriche di vitamina D erano confrontabili con quelle riportate nei soggetti affetti da NASH (20.3±10.7 ng/ml vs 20.9±12.3 ng/ml, p=n.s.). L'espressione del VDR era riscontrabile non soltanto a livello nucleare ma anche a livello citoplasmatico (Figura 2) sia nei colangiociti che negli epatociti.

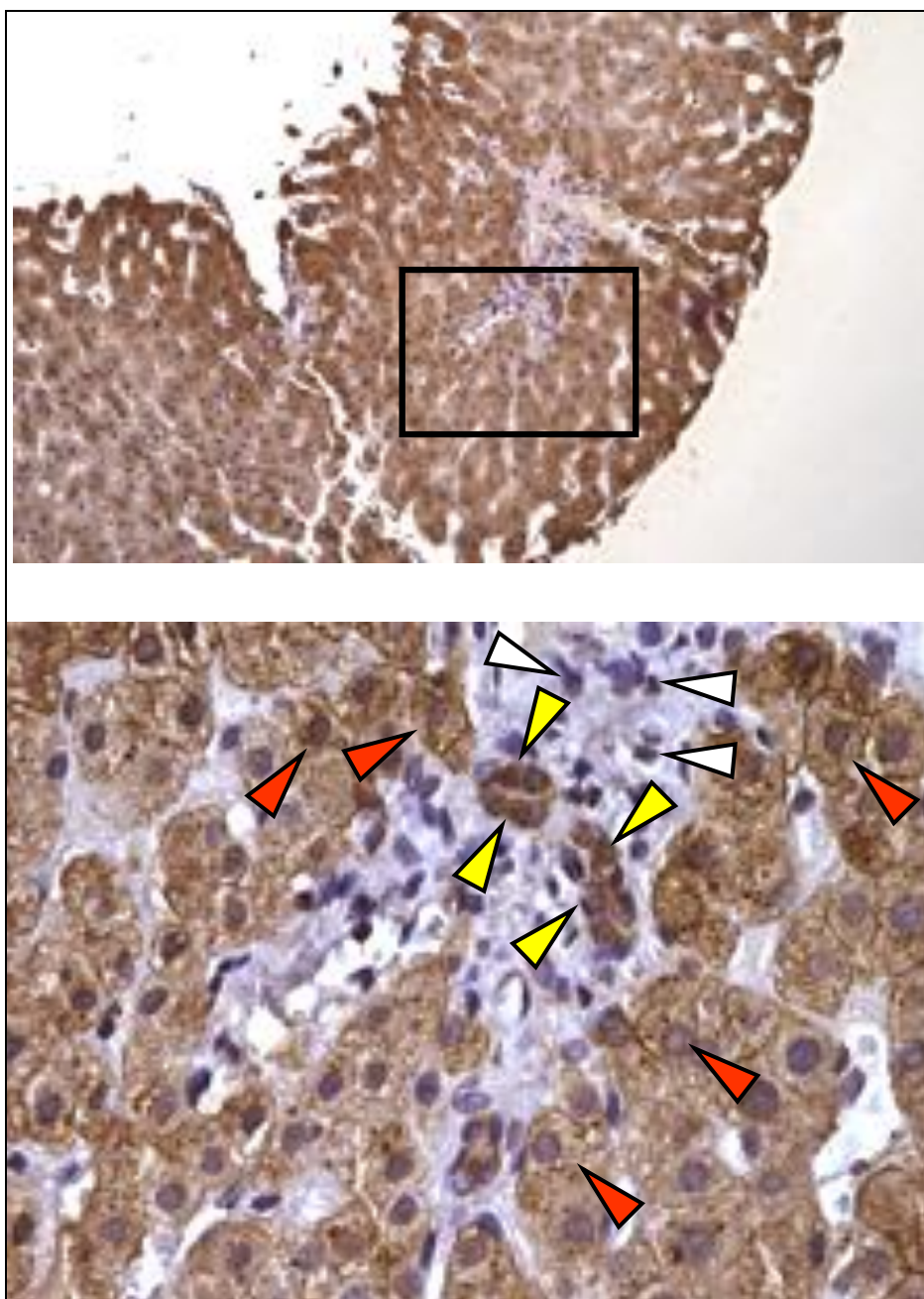


Figura 2. Espressione del VDR nel citoplasma e nel nucleo di epatociti (freccie rosse), colangiociti (freccie gialle) e cellule infiammatorie (freccie bianche) (Ingrandimento 40x1)

La VDR+ non correlava con i livelli sierici di 25(OH)D₃ né con i parametri clinici e biochimici considerati, mentre è stata riscontrata una associazione molto significativa tra VDR+ nelle cellule del parenchima e l'espressione di CYP2R1 e CYP27A1.

La VDR+ negli epatociti correlava in maniera significativa anche con la presenza di un infiltrato infiammatorio positivo per VDR ($p= 0.01$) (Tabella 2).

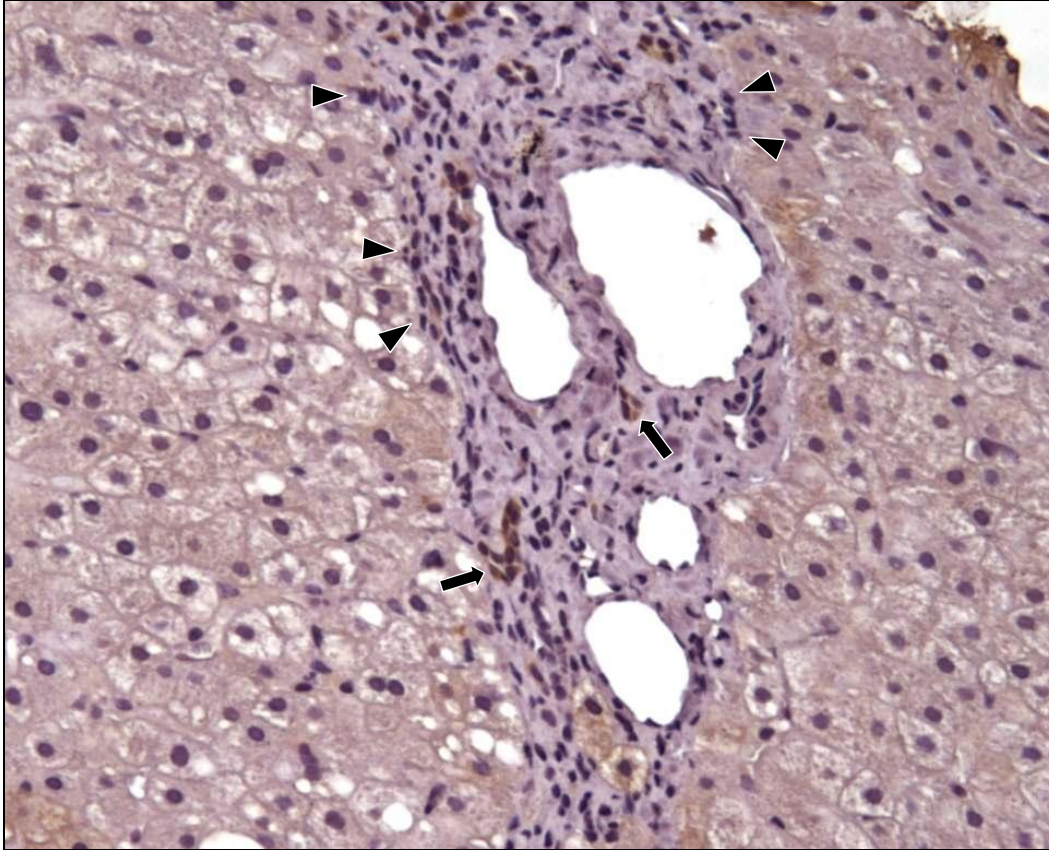
Tabella 2. Analisi di correlazione bivariata tra entità della VDR+ negli epatociti (a sinistra) e nei colangiociti (a destra) e i parametri clinico-istologici di epatite.

Parametro	VDR+ Epatociti		VDR+ Colangiociti	
	<i>Spearman's rho</i>	<i>P-value</i>	<i>Spearman's rho</i>	<i>P-value</i>
<i>Età</i>	- 0.2	n.s.	- 0.05	n.s.
<i>Sesso (M vs F)</i>	- 0.23	n.s.	- 0.03	n.s.
<i>25(OH)D</i>	0.23	n.s.	0.28	n.s.
<i>AST</i>	- 0.2	n.s.	- 0.1	n.s.
<i>ALT</i>	- 0.09	n.s.	- 0.1	n.s.
<i>Grading</i>	- 0.2	n.s.	- 0.1	n.s.
<i>Staging</i>	- 0.1	n.s.	- 0.09	n.s.
<i>CYP27A1</i>	0.56	0.001	0.48	0.004
<i>CYP2R1</i>	0.7	0.0001	0.51	0.002
<i>VDR+ epatociti</i>	-	-	0.44	0.01
<i>VDR+ colangiociti</i>	0.44	0.01	-	-
<i>VDR+c.infiammatorie</i>	0.43	0.01	0.23	n.s.

Infiammazione e fibrosi

Il grado di necro-infiammazione riscontrato all'esame istologico era significativamente maggiore nei soggetti con una scarsa positività per il VDR nelle cellule infiammatorie infiltranti il parenchima epatico (Coeff. Spearman: -0.55, $p < 0.009$) e, in generale, negli epatociti (Coeff. Spearman: -0.43, $p < 0.03$) (Figure 3a e 3b).

3a)



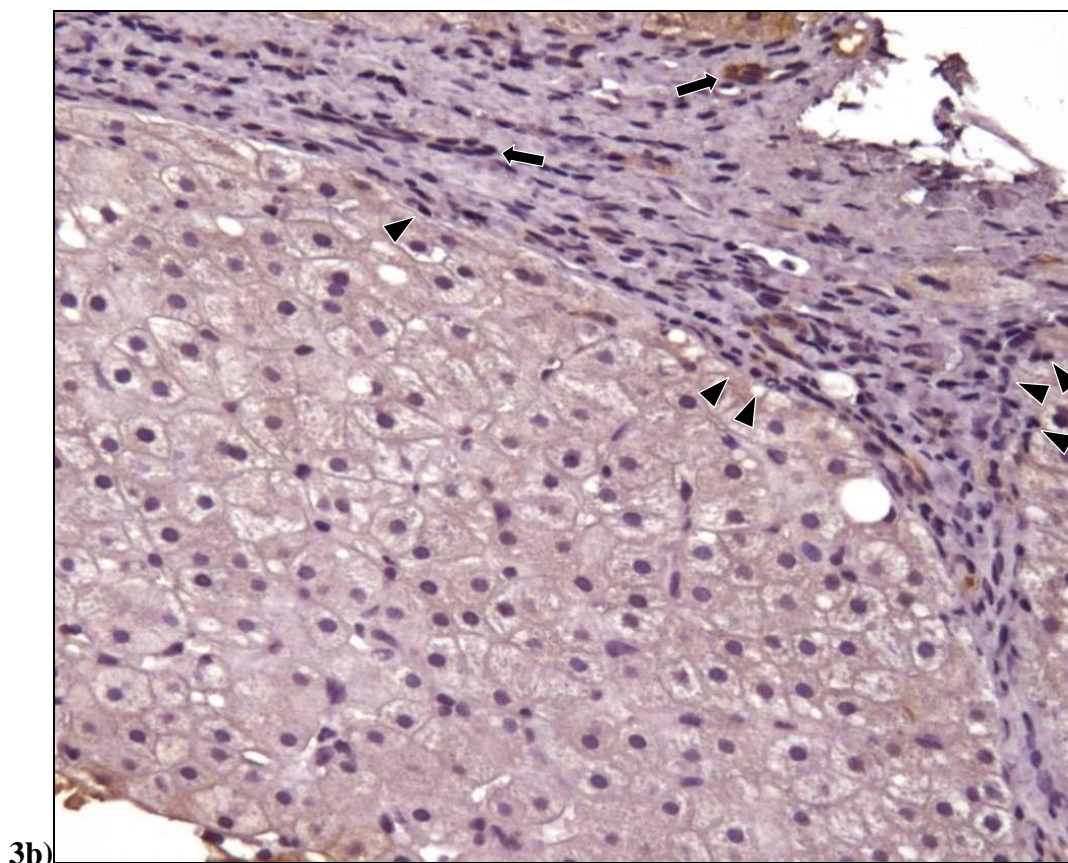


Figura 3a e 3b. Paziente con epatite HCV e importante infiltrato infiammatorio. Colangiociti (freccette) e cellule infiammatorie (triangoli) scarsamente positivi per VDR. Epatociti negativi per VDR. Ingrandimento 20x1.

Inoltre, la presenza di VDR+ nelle cellule infiammatorie correlava con una maggiore espressione epatica del CYP2R1 (Coeff. Spearman: 0.49, $p < 0.005$) ma non del CYP27A.

Nella nostra popolazione uno staging di fibrosi più avanzato si associava al sesso maschile, all'incremento delle transaminasi e a una minore espressione del CYP27A1 a livello epatocitario ($p = 0.03$), come mostra la tabella 3.

Relazione con la concentrazione sierica di 25(OH)D

La popolazione studiata è stata inoltre suddivisa in quartili in relazione alla concentrazione di 25(OH)D₃ misurata nel siero il giorno dell'esecuzione della biopsia epatica.

Non sono state riscontrate caratteristiche clinico-biochimiche differenti negli individui appartenenti a quartili differenti di vitamina D.

I soggetti appartenenti al quartile inferiore di vitamina D (25(OH)D₃ < 11.6 ng/ml) mostravano una espressione epatica del CYP2R1 significativamente ridotta rispetto agli individui appartenenti al quartile superiore (25(OH)D > 26.4 ng/ml) (Coeff. Spearman:0.50, p= 0.02), mentre l'espressione epatica del CYP27A1 non influenzava la concentrazione ematica di vitamina D.

Tabella 3. Correlazione tra lo stadio di fibrosi e le caratteristiche clinico-istologiche.

	Spearman's coefficient	P- value
<i>Età</i>	- 0.1	n.s.
<i>Sesso (M vs F)</i>	0.36	0.01
<i>Grading</i>	0.52	0.0001
<i>AST</i>	0.56	0.0001
<i>ALT</i>	0.45	0.002
<i>CYP27A1</i>	- 0.49	0.03
<i>CYP2R1</i>	- 0.11	n.s.
<i>VDR+ epatociti</i>	- 0.09	n.s.
<i>VDR+ epatociti</i>	0.1	n.s.

Conclusioni

Lo studio condotto sulle biopsie ottenute dai pazienti affetti da NASH o HCV ha dimostrato una spiccata positività per l'espressione del VDR nel citoplasma e nel nucleo di epatociti e colangiociti, oltre che nelle cellule infiammatorie infiltranti il parenchima epatico in corso di insulto cronico.

La spiegazione della forte positività per VDR non soltanto nel nucleo delle cellule, dove notoriamente questo steroide compie la sua funzione biologica, ma anche nel citosol, è fornita da precedenti studi di biologia molecolare. Questi hanno dimostrato che il VDR si trova originariamente nel citosol e, a seguito del legame con uno specifico ligando, viene traslocato nel nucleo (Michigami T, 1999), dove forma un eterodimero con il recettore del retinoide X (RXR) α e si lega a specifici elementi di risposta nel DNA (Drocourt L, 2002).

NASH

Nei pazienti affetti da NASH una minore concentrazione sierica di 25(OH)D si associava con la presenza di *ballooning* degli epatociti, uno degli indici di infiammazione epatica. Inoltre nei pazienti con una maggiore espressione del VDR in colangiociti ed epatociti era presente un grado inferiore di steatosi, infiammazione e fibrosi.

La positività per il VDR nelle popolazioni cellulari epatiche si associava a una maggiore espressione del CYP2R1 a carico degli epatociti.

HCV

Allo stesso modo, nella popolazione affetta da HCV è stata riscontrata un'associazione molto significativa tra VDR+ su colangiociti ed epatociti ed espressione epatica dei citocromi idrossilanti la vitamina D (CYP27A1 e CYP2R1). L'espressione del VDR nelle cellule epatiche non correlava con la concentrazione sierica di 25(OH)D₃, né con lo stadio della malattia.

Dallo studio sull'espressione dei citocromi in sede epatocitaria abbiamo potuto osservare che una ridotta espressione del CYP2R1, ma non del CYP27A1, correlava fortemente sia con la presenza di ipovitaminosi D, diagnosticata attraverso dosaggio sierico della 25(OH)D₃, sia con una bassa espressione del VDR a livello dell'infiltrato infiammatorio. L'espressione del CYP27A1, citocromo ad alta capacità e bassa affinità per la vitamina D, era, invece, inversamente associata allo stadio di fibrosi nei pazienti affetti da HCV, come osservato anche in precedenza da un diverso gruppo di ricercatori (Pitta S, 2010), ma non influenzava i livelli sierici di 25(OH)D.

Il riscontro di una correlazione inversa tra i livelli sierici di 25(OH)D₃ e l'espressione del CYP2R1 nei soggetti con HCV, mai riportata in letteratura precedentemente, è in linea con le evidenze che attribuiscono al CYP2R1 un ruolo chiave nella idrossilazione epatica della vitamina D e che associano alla mutazione del gene codificante per questo citocromo la presenza di ipovitaminosi D severa e delle patologie correlate (Holick MF, 2004).

Il nostro studio ha inoltre dimostrato per la prima volta che nei pazienti con epatopatia HCV-correlata la negatività per il VDR dell'infiltrato infiammatorio si associava strettamente ad un grado di necro-infiammazione più severo, indipendentemente dalla concentrazione sierica di vitamina D.

La presenza di VDR+ nell'infiltrato infiammatorio e nei colangiociti potrebbe spiegare le modalità attraverso cui la vitamina D agisce nel modulare la risposta infiammatoria in corso di epatopatia.

Nel presente studio è stata osservata una forte espressione del VDR nei colangiociti. Studi

precedenti hanno dimostrato che il VDR può essere attivato dall'acido litocolico (LCA) (Makishima M, 2002) influenzando, così, il percorso di detossificazione degli acidi biliari. Han S et al. hanno identificato il VDR -proteina e mRNA- in colture primarie di epatociti umani e hanno dimostrato che questo recettore gioca un ruolo critico nella inibizione della sintesi degli acidi biliari, proteggendo le cellule del fegato durante la colestasi. Il VDR attivato da LCA acetato o dalla $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, infatti, è in grado di inibire fortemente la trascrizione del gene CYP7A1, enzima iniziale e *rate-limiting* nella via di sintesi degli acidi biliari nel fegato (Chiang JY, 2003), riducendo la sintesi degli acidi biliari negli epatociti umani (Han S, 2009).

Autorevoli studi hanno dimostrato che i colangiociti proliferanti rivestono un ruolo chiave nella induzione della fibrosi, sia direttamente attraverso la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), sia indirettamente attraverso l'attivazione di altri tipi di cellule del fegato. La EMT si riferisce al processo attraverso cui le cellule epiteliali mature perdono il contatto intercellulare e l'espressione del pattern proteico tipico degli epitelii per acquisire le caratteristiche fenotipiche delle cellule mesenchimali (Glaser SS, 2008). Recentemente, la EMT è stato implicata nella patogenesi della fibrosi epatica (Diaz R, 2008).

La vitamina D potrebbe agire, di conseguenza, sia direttamente sulle cellule infiammatorie infiltranti il parenchima epatico, sia indirettamente sulle cellule stellate attraverso il coinvolgimento dei colangiociti. I risultati finora ottenuti ci permettono, pertanto, di ipotizzare un ruolo attivo della vitamina D nell'influenzare il decorso dell'epatopatia in atto grazie alla sua azione sulle differenti popolazioni cellulari presenti nel fegato.

Discussione

Gli studi sperimentali condotti per questo progetto hanno indagato la relazione tra l'ipovitaminosi D e la presenza di malattie del metabolismo come la SM, il T2D e la presenza di NAFLD. Lo studio condotto su una vasta popolazione di soggetti afferenti presso gli ambulatori di Malattie Metaboliche per sospetta SM ha permesso di evidenziare una forte correlazione tra ridotti livelli sierici di 25(OH)D₃ e la presenza e severità di NAFLD. In precedenza, un'associazione indipendente tra basse concentrazioni di 25(OH)D₃ e la stadiazione istologica della NASH era stata riscontrata in una popolazione di pazienti con ipertransaminasemia cronica sottoposti a biopsia epatica per sospetta steatoepatite (Targher G, 2007).

Questo progetto è stato, invece, disegnato allo scopo di indagare il rapporto tra steatosi epatica valutata ecograficamente e ipovitaminosi D in una coorte molto più vasta di soggetti con sospetta SM e senza alcuna precedente diagnosi di malattia epatica, approfonditamente caratterizzati a livello clinico e biochimico.

Per la valutazione della steatosi epatica in questa popolazione abbiamo utilizzato l'ecografia, tecnica non invasiva che ha dimostrato una sensibilità dell'83% e una specificità del 100% per diagnosi di steatosi epatica rispetto alla applicazione dei criteri istologici (Savarymuttu SH, 1986). Infatti, la maggior parte dei pazienti affetti da NAFLD, non sviluppa una malattia progressiva del fegato e può essere gestita senza bisogno di biopsia epatica, anche per ragioni etiche.

In questa popolazione è stato inoltre calcolato il Fatty Liver Index (FLI), un indice derivato da parametri clinico-biochimici e considerato un indicatore accurato di steatosi epatica nella popolazione generale (Bedogni G, 2006). Il nostro studio ha evidenziato per la prima volta una forte associazione tra il FLI e la presenza di una bassa concentrazione di 25(OH)D₃ indipendentemente da sesso, età e grado di insulino-resistenza.

La vitamina D è una molecola con struttura lipofila e pertanto tende ad accumularsi preferenzialmente a livello adipocitario. Di conseguenza, la concentrazione sierica di 25(OH)D₃ è in parte influenzata dalla composizione corporea. Il riscontro di ipovitaminosi D in soggetti con steatosi potrebbe, perciò, essere legato alla compartimentalizzazione della 25(OH)D₃ per la presenza, in questi pazienti, di un maggiore volume di distribuzione. La suddivisione della popolazione in quartili in relazione alla concentrazione sierica di vitamina D ha infatti dimostrato che il sottogruppo con livelli di 25(OH)D₃ inferiori aveva, oltre a una maggior prevalenza di NAFLD, anche maggiori BMI, circonferenza vita e prevalenza di SM.

La conferma dell'esistenza di un'associazione indipendente tra ipovitaminosi D e steatosi epatica è stata ottenuta studiando una sottopopolazione di soggetti normopeso. In questa coorte la presenza di NAFLD si associava a ridotti livelli di 25(OH)D₃ indipendentemente da tutti i possibili fattori di confondimento, incluso il BMI.

Per approfondire il ruolo del tessuto adiposo nel determinare ipovitaminosi D nei soggetti sovrappeso è stata selezionata una popolazione adulta di soggetti obesi con o senza SM, confrontabili per sesso, età, BMI, circonferenza vita, circonferenza fianchi e percentuale di massa grassa misurata attraverso metodo impedenziometrico. Questo studio ha evidenziato che la presenza di ipovitaminosi D si associa alla diagnosi di SM indipendentemente dagli indici antropometrici e dalla massa grassa, suggerendo l'esistenza di un nesso causale tra ipovitaminosi D e fenotipo dismetabolico nelle popolazioni studiate.

È stato ampiamente dimostrato da studi *in vivo* e *in vitro* che la vitamina D esercita una azione insulino-sensibilizzante, aumentando l'espressione dei recettori dell'insulina nei tessuti periferici e facilitando il trasporto del glucosio insulino-mediato (Borissova AM, 2003; Boucher BJ, 1995; Orwall E, 1994). Inoltre, la vitamina D regola direttamente il metabolismo dei FFA mediante la sua azione sul PPAR- γ e migliora l'insulino-resistenza indotta da FFA *in vitro*. Pertanto, in condizioni di carenza di vitamina D, l'aumento del flusso dei FFA nel

torrente ematico potrebbe da un lato peggiorare il grado di insulino-resistenza e dall'altro promuovere il deposito di lipidi nel fegato e facilitare lo sviluppo di NAFLD.

Per indagare il metabolismo della vitamina D in corso di epatite e comprendere se questa molecola potesse svolgere un'azione diretta sul fegato, abbiamo effettuato lo studio immunoistochimico dell'espressione delle 25-idrossilasi e del VDR in sede epatica.

Lo studio istologico ha dimostrato nei soggetti con NASH che la presenza di basse concentrazioni sieriche di 25(OH)D₃ si associa ad un maggior danno epatocitario e che la minore espressione del VDR su colangiociti ed epatociti correla con un NAS score più severo. In questi pazienti l'espressione dei due tipi di 25-idrossilasi è ben conservata e non influenza i livelli sierici di 25(OH) vitamina D.

Nei pazienti con epatite da HCV abbiamo invece osservato una correlazione diretta tra l'espressione del VDR e delle 25-idrossilasi negli epatociti e una ridotta espressione di CYP27A1 in presenza di fibrosi severa, indipendentemente dalla concentrazione sierica di vitamina D.

Questo studio ha dimostrato per la prima volta che il danno necro-infiammatorio in corso di epatite da HCV correla inversamente con la positività per VDR nelle cellule infiammatorie infiltranti il parenchima epatico.

Nel loro insieme i risultati ottenuti fanno ipotizzare che la vitamina D in corso di NASH e di epatite da HCV potrebbe svolgere un'azione sul fegato mediata dal legame con il VDR, ampiamente espresso sulle diverse popolazioni cellulari del fegato e sulle cellule infiammatorie. Attraverso questa modalità, la vitamina D potrebbe, verosimilmente, influenzare la risposta infiammatoria in corso di insulto cronico, come avviene in altri tessuti e organi.

Oltre al ruolo immunomodulatorio e antiproliferativo sulle cellule infiammatorie infiltranti il parenchima epatico, la vitamina D potrebbe influenzare la risposta flogistica indirettamente mediante l'azione sui colangiociti, nei quali l'espressione del VDR è particolarmente pronunciata.

È importante sottolineare che il disegno sperimentale dello studio non permette di dimostrare la presenza di un nesso causale tra il riscontro di ipovitaminosi D e la diagnosi di NAFLD/NASH. Tuttavia, lo studio immunoistochimico ha dimostrato una conservata espressione delle 25-idrossilasi CYP2R1 e CYP27A1 nei pazienti con steatoepatite. Questa osservazione rende dubbia l'ipotesi di una perdita della capacità idrossilante della vitamina D in corso di NASH. Viceversa, la carenza di 25(OH)D₃ potrebbe favorire, insieme ai fattori di rischio noti, l'accumulo intraepatico di lipidi, il peggioramento dell'insulino-resistenza epatica e lo sviluppo di steatosi e steatoepatite.

In conclusione, questo studio dimostra la presenza di una forte associazione tra ipovitaminosi D e malattie metaboliche associate all'insulino-resistenza. In particolare, bassi livelli sierici di vitamina D₃ si associano alla presenza e alla severità di NAFLD e NASH, valutate attraverso parametri clinici, ecografici e istologici. Sebbene non sia possibile dimostrare la presenza di un nesso causale, questi risultati fanno ipotizzare che la vitamina D₃, attraverso il legame con il VDR ampiamente espresso a livello epatico, possa influenzare significativamente la risposta del fegato al danno cronico indotto da differenti *noxae pathogenae*. Studi longitudinali disegnati *ad hoc* potrebbero chiarire il ruolo della ipovitaminosi D nella patogenesi, progressione e prognosi delle epatopatie su base metabolica e virale.

Bibliografia

- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2009. *Diabetes Care* 2009;32 Suppl 1:S13-61.
- Anderson JL, May HT, Horne BD, Bair TL, Hall NL, Carlquist JF, et al. Intermountain Heart Collaborative (IHC) Study Group. Relation of vitamin D deficiency to cardiovascular risk factors, disease status, and incident events in a general healthcare population. *Am J Cardiol* 2010;106(7):963-968.
- Angelico F, Del Ben M, Conti R, Francioso S, Feole K, Fiorello S, et al. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(3):1578-1582.
- Arteh J, Narra S, Nair S. Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease. *Dig Dis Sci*. 2010 Sep;55(9):2624-8.
- Barbato A, Iacone R, Tarantino G, Russo O, Sorrentino P, Avallone S, Galletti F, Farinaro E, Della Valle E, Strazzullo P. Relationships of PAI-1 levels to central obesity and liver steatosis in a sample of adult male population in southern Italy. *Intern Emerg Med*. 2009;4:315-323.
- Baynes KC, Boucher BJ, Feskens EJ, Kromhout D. Vitamin D, glucose tolerance and insulinaemia in elderly men. *Diabetologia* 1997;40:344-347.
- Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol*. 2006;6:33.
- Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Castiglione A, Crocè LS, Tiribelli C, et al. Incidence and natural course of fatty liver in the general population: the Dionysos study. *Hepatology* 2007;46(5):1387-1391.
- Berger U, Wilson P, McClelland RA, Colston K, Haussler MR, Pike JW, and Coombes RC. Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;6:607.
- Bitetto D, Fabris C, Fornasiere E, Pipan C, Fumolo E, Cussigh A, Bignulin S, Cmet S, Fontanini E, Falletti E, Martinella R, Pirisi M, Toniutto P. Vitamin D supplementation improves response to antiviral treatment for recurrent hepatitis C. *Transpl Int*. 2010;Jul 22.
- Bland R, Markovic D, Hills CE, Hughes SV, Chan SL, Squires PE, Hewison M. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase in pancreatic islets. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90:121-125.
- Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, Dakovska L, Kovacheva R. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Int J Clin Pract* 2003;57:258-261.
- Boucher BJ, Mannan N, Noonan K, Hales CN, Evans SJ. Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in east London Asians. *Diabetologia* 1995;38:1239-124.
- Bourlon PM, Billaudel B, Faure-Dussert A. Influence of vitamin D3 deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. *J Endocrinol* 1999;160:87-95.
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387-1395.
- Bruno CM, Valenti M, Bertino G, Ardiri A, Consolo M, Mazzarino CM, Amoroso A,

- Neri S. Altered pattern of circulating matrix metalloproteinases -2,- 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in patients with HCV-related chronic hepatitis. Relationship to histological features. *Panminerva Med.* 2009 Dec;51(4):191-6.
- Bruyère O, Malaise O, Neuprez A, Collette J and Reginster JY. Prevalence of vitamin D inadequacy in European postmenopausal women. *Curr Med Res Opin* 2007;23:1939–1944.
 - Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr, Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, et al. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell.* 2004;119:285–298.
 - Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med.* 2005;11:183–190.
 - Caldwell SH, Crespo DM. The spectrum expanded: cryptogenic cirrhosis and the natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2004;40:578–584.
 - Cheng S, Massaro JM, Fox CS, Larson MG, Keyes MJ, McCabe EL, Robins SJ, O'Donnell CJ, Hoffmann U, Jacques PF, Booth SL, Vasan RS, Wolf M, Wang TJ. Adiposity, cardiometabolic risk, and vitamin D status: the Framingham Heart Study. *Diabetes.* 2010 Jan;59(1):242-8.
 - Chiang JY. Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Bile acids and nuclear receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G349–G356.
 - Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and β -cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004;79:820–825.
 - Compston JE. Hepatic osteodystrophy: vitamin D metabolism in patients with liver disease. *Gut.* 1986 Sep;27(9):1073-90.
 - Dawson-Hughes, B. et al. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 2005;16, 713–716.
 - DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004;80,1689S–1696S.
 - Diaz R, Kim JW, Hui JJ, Li Z, Swain GP, Fong KS, Csiszar K, Russo PA, Rand EB, Furth EE, Wells RG. Evidence for the epithelial to mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis. *Human Pathology.* 2008;39:102–115.
 - Dobak J, Grzybowski J, Liu FT, Landon B, Dobke M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases collagen production in dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 1994 Aug;8(1):18-24.
 - Drocourt L, Ourlin JC, Pascussi JM, Maurel P, and Vilarem MJ. Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes. *J Biol Chem* 2002;277: 25125–25132.
 - Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:S99–S112.
 - Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes.* 2002;51:1131–1137.
 - Flegal KM, Shepherd JA, Looker AC, Graubard BI, Borrud LG, Ogden CL, et al. Comparisons of percentage body fat, body mass index, waist circumference, and waist-stature ratio in adults. *Am J Clin Nutr* 2009;89(2):500-508.
 - Forouhi NG, Luan J, Cooper A, Boucher BJ, Wareham NJ. Baseline serum 25-hydroxy vitamin d is predictive of future glycemic status and insulin resistance: the Medical Research Council Ely Prospective Study 1990-2000. *Diabetes* 2008;57(10):2619-2625.

- Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB Sr, O'Donnell CJ. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007;116:39–48
- Fujita K, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M, Fujimoto Y, Fujitake M, et al. Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology* 2009;50(3):772–780.
- Garcíade León Mdel C, Montfort I, Tello Montes E, López Vancell R, Olivos García A, González Canto A, Nequiz-Avedaño M, Pérez-Tamayo R. Hepatocyte production of modulators of extracellular liver matrix in normal and cirrhotic rat liver. *Exp Mol Pathol*. 2006 Feb;80(1):97–108.
- Gascon-Barré M, Demers C, Mirshahi A, Néron S, Zalzal S, and Nanci A. The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells. *Hepatology* 2003;37:1034–1042.
- Gedik O, Akalin S. Effects of vitamin D deficiency and repletion on insulin and glucagon secretion in man. *Diabetologia* 1986;29:142–145.
- Glaser SS, Gaudio E, Miller T, Alvaro D, Alpini G. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert Rev Mol Med*. 2009;25,11:e7.
- Grant WB. Vitamin D supplementation could reduce the risk of type A influenza infection and subsequent pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*. 2010 Oct;29(10):987.
- Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive summary. *Circulation* 2005;112:e285–e290.
- Gulseth HL, Gjelstad IM, Tierney AC, Lovegrove JA, Defoort C, Blaak EE, Lopez-Miranda J, Kiec-Wilk B, Risérus U, Roche HM, Drevon CA, Birkeland KI. Serum vitamin D concentration does not predict insulin action or secretion in European subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2010;33(4):923–5.
- Gupte P, Amarapurkar D, Agal S, Baijal R, Kulshrestha P, Pramanik S, et al. Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:854–858.
- Hamada T, Fondevila C, Busuttil RW, Coito AJ. Metalloproteinase-9 deficiency protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*. 2008 Jan;47(1):186–98
- Han S, Chiang JY. Mechanism of vitamin D receptor inhibition of cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2009;37:469–478.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357,266–281.
- Holick, M. F. 25-OH-vitamin D assays. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 90, 3128–3129.
- Holick, M. F. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357, 266–281.
- Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Shoelson SE, Shulman GI. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2002;109:1321–1326.
- Hyppönen E, Boucher BJ, Berry DJ, Power C. 25-hydroxyvitamin D, insulin-like growth factor 1 and metabolic syndrome at age 45y: a cross-sectional study in the 1958 British birth cohort. *Diabetes* 2008;57:298–305.
- Hyppönen E, Power C. Vitamin D status and glucose homeostasis in the 1958 British birth cohort: the role of obesity. *Diabetes Care* 2006;29:2244–2246.

- Inomata S, Kadowaki S, Yamatani T, Fukase M, Fujita T. Effect of 1 α (OH)-vitamin D3 on insulin secretion in diabetes mellitus. *Bone Miner* 1986;1:187–192.
- Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 1995;22:696–699.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:621–663.
- Kendrick J, Targher G, Smits G, Chonchol M. 25-Hydroxyvitamin D deficiency is independently associated with cardiovascular disease in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis* 2009;205(1):255-260.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1313-21.
- Klover PJ, Zimmers TA, Koniaris LG, Mooney RA. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes* 2003;52:2784–2789.
- Koli K, Keski-Oja J. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues down-regulate cell invasion-associated proteases in cultured malignant cells. *Cell Growth Differ*. 2000 Apr;11(4):221-9.
- Konradsen S, Ag H, Lindberg F, Hexeberg S, Jorde R. Serum 1,25-dihydroxy vitamin D is inversely associated with body mass index. *Eur J Nutr* 2008;47:87–91.
- Koshiyama H, Ikeda H, Honjo S, Nakamura Y, Tanaka K, Tsugawa N, Okano T. Hypovitaminosis D is frequent in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007 Jun;76(3):470-1.
- Kotronen A, Westerbacka J, Bergholm R, Pietiläinen KH, Yki-Järvinen H. Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(9):3490-3497.
- Lange CM, Bojunga J, Ramos-Lopez E, von Wagner M, Hassler A, Vermehren J, Herrmann E, Badenhoop K, Zeuzem S, Sarrazin C. Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy. *J Hepatol*. 2011 May;54(5):887-93.
- Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int* 2009;29(1): 113-119.
- Lind L, Pollare T, Hvarfner A, Lithell H, Sorensen OH, Ljunghall S Long-term treatment with active vitamin D (α -calcitriol) in middle-aged men with impaired glucose tolerance. Effects on insulin secretion and sensitivity, glucose tolerance and blood pressure. *Diabetes Res*;198911:141–147.
- Lips P. Vitamin D status and nutrition in Europe and Asia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103, 620–625.
- Lips, P. Vitamin D status and nutrition in Europe and Asia. *J. Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103, 620–625.
- Liu S, Song Y, Ford ES, Manson JE, Buring JE, Ridker PM. Dietary calcium, vitamin D, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women. *Diabetes Care* 2005;28:2926–2932.
- Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, Haussler MR, Mangelsdorf DJ. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 2002;17;296(5571):1313-6.
- Martini LA, Wood RJ. Vitamin D status and the metabolic syndrome. *Nutr Rev* 2006;64:479–486.

- Martins D, Wolf M, Pan D, Zadshir A, Tareen N, Thadhani R, Felsenfeld A, Levine B, Mehrotra R, Norris K. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 2007;167:1159–1165.
- Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999;22:1462–1470.
- McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004;8:521–533, viii.
- Michigami T, Suga A, Yamazaki M, Shimizu C, Cai G, Okada S, and Ozono K. Identification of amino acid sequence in the hinge region of human vitamin D receptor that transfers a cytosolic protein to the nucleus. *J Biol Chem* 1999;274: 33531–33538.
- Mithal, A. et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 2009;20,1807–1820.
- Nnoaham KE, Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 2008 Feb;37(1):113-9.
- Nyomba BL, Auwerx J, Bormans V, Peeters TL, Pelemans W, Reynaert J, Bouillon R, Vantrappen G, De Moor P. Pancreatic secretion in man with subclinical vitamin D deficiency. *Diabetologia* 1986;29:34–38.
- Orwoll E, Riddle M, Prince M. Effects of vitamin D on insulin and glucagon secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 1994;59:1083–1087.
- Palomer X, González-Clemente JM, Blanco-Vaca F, Mauricio D. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2008;10:185–197.
- Parikh SJ, Edelman M, Uwaifo GI, Freedman RJ, Semega-Janneh M, Reynolds J, Yanovski JA. The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1196–1199.
- Pinelli NR, Jaber LA, Brown MB, Herman WH. Serum 25-hydroxy vitamin d and insulin resistance, metabolic syndrome, and glucose intolerance among Arab Americans. *Diabetes Care* 2010;33(6):1373-1375.
- Petta S, Cammà C, Scazzone C, Tripodo C, Di Marco V, Bono A, Cabibi D, Licata G, Porcasi R, Marchesini G, Craxí A. Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2010 Apr;51(4):1158-67.
- Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2017–2029.
- Powell EE, Jonsson JR, Clouston AD. Dangerous liaisons: the metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 2005;143:753–754.
- Rammos G, Tseke P, Ziakka S, Rammos G, Tseke P, Ziakka S. Vitamin D, the renin-angiotensin system, and insulin resistance. *Int Urol Nephrol* 2008;40:419–426.
- Rosenstreich SJ, Rich C, Volwiler W. Deposition in and release of vitamin D3 from body fat: evidence for a storage site in the rat. *J Clin Invest* 1971;50:679–687.
- Saverymuttu SH, Joseph AE, Maxwell JD. Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986;292(6512):13-15.
- Scholze J, Alegria E, Ferri C, Langham S, Stevens W, Jeffries D, Uhl-Hochgraeber K. Epidemiological and economic burden of metabolic syndrome and its consequences in patients with hypertension in Germany, Spain and Italy; a prevalence-based model. *BMC Public Health.* 2010 Sep 2;10:529.

- Segura C, Alonso M, Fraga C, García-Caballero T, Diéguez C, and Pérez-Fernández R. Vitamin D receptor ontogenesis in rat liver. *Histochem Cell Biol* 1999;112: 163–167.
- Skinner RK, Sherlock S, Long RG, Wilis MR. 25-Hydroxylation of vitamin D in primary biliary cirrhosis. *Lancet*. 1977 Apr 2;1(8014):720-1.
- Snijder MB, van Dam RM, Visser M, Deeg DJ, Dekker JM, Bouter LM, Seidell JC, Lips P. Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: a population-based study in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jul;90(7):4119-23.
- Tai K, Need AG, Horowitz M, Chapman I. Vitamin D, glucose, insulin, and insulin sensitivity. *Nutrition* 2008;24:279–285.
- Tarantino G, Colicchio P, Conca P, Finelli C, Di Minno MN, Tarantino M, Capone D, Pasanisi F. Young adult obese subjects with and without insulin resistance: what is the role of chronic inflammation and how to weigh it non-invasively? *J Inflamm (Lond)* 2009;6:6.
- Tarantino G, Conca P, Pasanisi F, Ariello M, Mastrolia M, Arena A, Tarantino M, Scopacasa F, Vecchione R. Could inflammatory markers help diagnose nonalcoholic steatohepatitis? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;21:504–511.
- Targher G, Bertolini L, Scala L, Cigolini M, Zenari L, Falezza G, et al. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17(7):517-524.
- Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2010;363(14):1341-1350.
- Tavera-Mendoza, L. E. & White, J. H. Cell defenses and the sunshine vitamin. *Sci Am* 2007;297, 68–70.
- Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clin Proc*. 2011 Jan;86(1):50-60.
- Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Noonan K, Mills PG, Syndercombe-Court D, Aganna E, Price CP, Boucher BJ. Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *QJM*. 2002 Dec;95(12):787-96.
- Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z and Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000;72:690–693.
- Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000;72:690–693.
- Wu-Wong JR, Nakane M, Ma J. Effects of Vitamin D analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth cells. *Atherosclerosis* 2006; 186:20-28.
- Young KA, Engelman CD, Langefeld CD, Hairston KG, Haffner SM, Bryer-Ash M, Norris JM. Association of plasma vitamin D levels with adiposity in Hispanic and African Americans. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3306–3313.
- Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, Wolf E, Balling R, Erben RG 2003 Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J* 17:509–511.
- Zhou QG, Hou FF, Guo ZJ, Liang M, Wang GB, Zhang X. 1,25-Dihydroxyvitamin D improved the free fatty-acid-induced insulin resistance in cultured C2C12 cells. *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24(6):459-464.